

(11)特許出願公表番号
特表2002-510211
(P2002-510211A)

(43)公表日 平成14年4月2日(2002.4.2)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード* (参考)
C 1 2 N 15/02	Z N A	A 6 1 K 39/395	U
A 6 1 K 39/395		A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 37/06		43/00	1 1 3
43/00	1 1 3	C 0 7 K 16/42	
C 0 7 K 16/42		C 1 2 P 21/08	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 204 頁) 最終頁に続く			

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 204 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平11-507261
(86)(22)出願日	平成10年6月30日(1998.6.30)
(85)翻訳文提出日	平成11年12月30日(1999.12.30)
(86)国際出願番号	PCT/US98/13410
(87)国際公開番号	WO99/01556
(87)国際公開日	平成11年1月14日(1999.1.14)
(31)優先権主張番号	08/887,352
(32)優先日	平成9年7月2日(1997.7.2)
(33)優先権主張国	米国(US)

(71)出願人 ジェネンテック, インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080
—4990, サウス サンフランシスコ, ディ
ーエヌエー ウェイ 1 番地

(72)発明者 ロウマン, ヘンリー ビー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94018,
エル グラナダ, サン ファン アヴェニ
ュー 400

(72)発明者 プレスト, レナード ジー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94109,
サンフランシスコ, ガウ ストリート
1900 ナンバー206

(74)代理人 弁護士 園田 吉隆 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改良抗IgE抗体及びポリペプチドの改良方法

(57) 【要約】

本発明は、標的分子に対するポリペプチドの親和性を調節する方法であって、 a) 異性化を受けやすいアスパラチル残基を同定し； b) 代替残基を置換し、得られた変異体を標的分子に対する親和性でスクリーニングすることを含んでなる方法に関する。好適な実施態様では、残基の置換方法は、ファージディスプレイでの親和性成熟 (AMPD) である。更に好適な実施態様では、ポリペプチドは抗体で、標的分子は抗原である。更に好適な実施態様では、抗体は抗 IgE であり、標的分子は IgE である。他の実施態様では、本発明は IgE に対する親和性が改善された抗 IgE 抗体に関する。

(125) - 6.6.1

DQXUQDLS LAAPVCEVT ITCEASQVD YQDQXQVY QQOQXAPEL LTTAAKLES QVPEQDQD
 SCQDVLRLS SLAPQDQVY YQDQXQVY TPQOQDQVY KRTVAAPVY LPPHQDLE QDZAVVCL
 QDQVQDQVY QDQVQDQVY QDQVQDQVY QDQVQDQVY QDQVQDQVY QDQVQDQVY QDQVQDQVY
 QDQVQDQVY

(E25)*- 庭机

[illegible]

629 - 630

DIQAGQJ06 LEASVHRTV ITCRMEPTD QHQSTGHTV QQJGZAPKL LITVASTLES QVPAFQJ03
SOTUTLITE SLOQWYATV TQOQHQDPT YQOQHQKUL KRTVADSVF IYFPHQJ04 SOTAFVCLL
HPTVQJ04Y QWVTHALQD QHQQHVTVQ DQHQSTYLS STHLEKATV HIRKVTACEV THQGLASVY
KTFPHQD

(E2B) - 武備

NYGJWJG000	LVJPGHJAL	SCAVG000	SCY00000	AK000000	01100000	K0000000
NYGJWJG001	LVJPGHJAL	SCAVG001	SCY00001	AK000001	01100001	K0000001
NYGJWJG002	LVJPGHJAL	SCAVG002	SCY00002	AK000002	01100002	K0000002
NYGJWJG003	LVJPGHJAL	SCAVG003	SCY00003	AK000003	01100003	K0000003
NYGJWJG004	LVJPGHJAL	SCAVG004	SCY00004	AK000004	01100004	K0000004
NYGJWJG005	LVJPGHJAL	SCAVG005	SCY00005	AK000005	01100005	K0000005
NYGJWJG006	LVJPGHJAL	SCAVG006	SCY00006	AK000006	01100006	K0000006
NYGJWJG007	LVJPGHJAL	SCAVG007	SCY00007	AK000007	01100007	K0000007
NYGJWJG008	LVJPGHJAL	SCAVG008	SCY00008	AK000008	01100008	K0000008
NYGJWJG009	LVJPGHJAL	SCAVG009	SCY00009	AK000009	01100009	K0000009
NYGJWJG010	LVJPGHJAL	SCAVG010	SCY00010	AK000010	01100010	K0000010
NYGJWJG011	LVJPGHJAL	SCAVG011	SCY00011	AK000011	01100011	K0000011
NYGJWJG012	LVJPGHJAL	SCAVG012	SCY00012	AK000012	01100012	K0000012
NYGJWJG013	LVJPGHJAL	SCAVG013	SCY00013	AK000013	01100013	K0000013
NYGJWJG014	LVJPGHJAL	SCAVG014	SCY00014	AK000014	01100014	K0000014
NYGJWJG015	LVJPGHJAL	SCAVG015	SCY00015	AK000015	01100015	K0000015
NYGJWJG016	LVJPGHJAL	SCAVG016	SCY00016	AK000016	01100016	K0000016
NYGJWJG017	LVJPGHJAL	SCAVG017	SCY00017	AK000017	01100017	K0000017
NYGJWJG018	LVJPGHJAL	SCAVG018	SCY00018	AK000018	01100018	K0000018
NYGJWJG019	LVJPGHJAL	SCAVG019	SCY00019	AK000019	01100019	K0000019
NYGJWJG020	LVJPGHJAL	SCAVG020	SCY00020	AK000020	01100020	K0000020
NYGJWJG021	LVJPGHJAL	SCAVG021	SCY00021	AK000021	01100021	K0000021
NYGJWJG022	LVJPGHJAL	SCAVG022	SCY00022	AK000022	01100022	K0000022
NYGJWJG023	LVJPGHJAL	SCAVG023	SCY00023	AK000023	01100023	K0000023
NYGJWJG024	LVJPGHJAL	SCAVG024	SCY00024	AK000024	01100024	K0000024
NYGJWJG025	LVJPGHJAL	SCAVG025	SCY00025	AK000025	01100025	K0000025
NYGJWJG026	LVJPGHJAL	SCAVG026	SCY00026	AK000026	01100026	K0000026
NYGJWJG027	LVJPGHJAL	SCAVG027	SCY00027	AK000027	01100027	K0000027
NYGJWJG028	LVJPGHJAL	SCAVG028	SCY00028	AK000028	01100028	K0000028
NYGJWJG029	LVJPGHJAL	SCAVG029	SCY00029	AK000029	01100029	K0000029
NYGJWJG030	LVJPGHJAL	SCAVG030	SCY00030	AK000030	01100030	K0000030
NYGJWJG031	LVJPGHJAL	SCAVG031	SCY00031	AK000031	01100031	K0000031
NYGJWJG032	LVJPGHJAL	SCAVG032	SCY00032	AK000032	01100032	K0000032
NYGJWJG033	LVJPGHJAL	SCAVG033	SCY00033	AK000033	01100033	K0000033
NYGJWJG034	LVJPGHJAL	SCAVG034	SCY00034	AK000034	01100034	K0000034
NYGJWJG035	LVJPGHJAL	SCAVG035	SCY00035	AK000035	01100035	K0000035
NYGJWJG036	LVJPGHJAL	SCAVG036	SCY00036	AK000036	01100036	K0000036
NYGJWJG037	LVJPGHJAL	SCAVG037	SCY00037	AK000037	01100037	K0000037
NYGJWJG038	LVJPGHJAL	SCAVG038	SCY00038	AK000038	01100038	K0000038
NYGJWJG039	LVJPGHJAL	SCAVG039	SCY00039	AK000039	01100039	K0000039
NYGJWJG040	LVJPGHJAL	SCAVG040	SCY00040	AK000040	01100040	K0000040
NYGJWJG041	LVJPGHJAL					

(四)·輕金

DQGLQSDPS LAASVKEVFT ITCLAKFPO GHDGTHSVY OQKQHAUFL LITRAFLYS CVPELPOG
 RQNFILAKS SLQDFPATT YQOQSGHFT TWQQTVEYI KRIYAAVFT LFFPHQKLE AGQASVVL
 RSTFPAHY QVQVQALQS GHDGSHVQK DQDQSTFLS STLTAKAVY KSKVYTHVY THQCLAPV
 KXVDFHC

(227) 重刊

WJWALB000 LVP000LAL SCALV005 FT PUT000H00 AD000L00A SIX000H00 F0000000
R0000000 L0000000 T0000000 H0000000 W0000000 T0000000 F0000000
C0000000 S0000000 G0000000 S0000000 S0000000 S0000000
A0000000 P0000000 P0000000 P0000000 K0000000 P0000000
W0000000 A0000000 R0000000 T0000000 T0000000 K0000000
Q0000000 R0000000 C0000000 L0000000 L0000000 P0000000
W0000000 V0000000 T0000000 T0000000 K

Figure 12

【特許請求の範囲】

1. 標的分子に対するポリペプチドの親和性を調節する方法において、
 - a) 異性化を受けやすいアスパラチル残基を同定し；
 - b) 代替残基を置換し、得られた変異体を標的分子に対する親和性でスクリーニングする、ことを含んでなる方法。
2. 工程 b) がファージディスプレイを使用する親和性成熟である請求項 1 に記載の方法。
3. ポリペプチドが抗体である請求項 2 に記載の方法。
4. 抗体が抗 I g E 抗体であり、標的分子が I g E である請求項 3 に記載の方法。
5. 抗体が図 1 2 [配列番号：1 3－1 4]に「E 2 5」として示した配列である請求項 4 に記載の方法。
6. 置換された残基が可変軽鎖 C D R 1 残基 A s p 3 2 G l u、G l n 2 7 L y s 及び S e r 2 8 P r o である請求項 5 に記載の方法。
7. 更に置換された残基が可変重鎖 C D R 2 残基 T h r 5 3 L y s、A s p 5 5 S e r、S e r 5 7 G l u 及び A s n 5 9 L y s である請求項 6 に記載の方法。
8. F (a b) フラグメント [配列番号：1 9－2 0]、s F v フラグメント [配列番号：2 2]又は F (a b)'₂ [配列番号：2 4－2 5]からなる群から選択される e 2 6 配列を含んでなる抗体分子。
9. 図 1 2 [配列番号：1 5－1 6]の配列「e 2 6」に実質的に同一である配列を有してなる抗体分子。
- 1 0. F (a b) フラグメント [配列番号：1 9 及び 2 1]、s F v フラグメント [配列番号：2 3]又は F (a b)'₂ [配列番号：2 4 及び 2 6]からなる群から選択される e 2 7 配列を含んでなる抗体分子。
- 1 1. 図 1 2 [配列番号：1 7－1 8]の配列「e 2 7」に実質的に同一である配列を有してなる抗体分子。

12. 請求項1に記載された方法の適用の結果としてブタクサ誘発性ヒスタミン放出阻害性が改善された改良抗体又はその機能的フラグメント。

13. 請求項2に記載された方法の適用の結果としてブタクサ誘発性ヒスタミン放出阻害性が改善された改良抗体又はその機能的フラグメント。

14. F(ab)、sFV及びF(ab)₂からなる群から選択されるe26抗体フラグメントをコード化する配列を有してなる核酸分子。

15. e26をコード化するものと実質的に同一な配列を有してなる核酸分子。

16. F(ab)、sFV及びF(ab)₂からなる群から選択されるe27抗体フラグメントをコード化する配列を有してなる核酸分子。

15. e27をコード化するものと実質的に同一な配列を有してなる核酸分子。

18. 請求項1に記載された方法の適用の結果としてブタクサ誘発性ヒスタミン放出阻害性が改善された抗体をコード化する核酸分子。

19. 請求項2に記載された方法の適用の結果としてブタクサ誘発性ヒスタミン放出阻害性が改善された抗体をコード化する核酸分子。

20. F(ab) [配列番号：19-20]、sFv [配列番号：22] 及びF(ab)₂ [配列番号：24-25] からなる群から選択される配列を有するe26抗体分子と混合して医薬的に許容可能な賦形剤を含有してなる組成物。

21. 図12 [配列番号：15-16] の「e26」に実質的に同一である配列を有してなる抗体と混合して医薬的に許容可能な賦形剤を含有してなる組成物。

22. F(ab) [配列番号：19及び21]、sFv [配列番号：23] 及びF(ab)₂ [配列番号：24及び26] からなる群から選択される配列を有するe27抗体分子と混合して医薬的に許容可能な賦形剤を含有してなる組成物。

23. 図12 [配列番号：17-18] の「e27」に実質的に同一である配列を有してなる抗体と混合して医薬的に許容可能な賦形剤を含有してなる組成物。

24. F(ab) [配列番号：19-20]、sFv [配列番号：22] 及びF(ab)

b)'₂ [配列番号：24-25]からなる群から選択される配列を有するe26抗体分子の治療上有効量を投与することを含んでなる、哺乳動物におけるヒスタミンのIgE媒介性生成を低減又は防止する方法。

25. 図12 [配列番号：15-16]の「e26」に実質的に同一である配列を有してなる抗体の治療上有効量を投与することを含んでなる、哺乳動物におけるヒスタミンのIgE媒介性生成を低減又は防止する方法。

26. [配列番号：15-16]からなる群から選択される配列を有するe27抗体分子の治療上有効量を投与することを含んでなる、哺乳動物におけるヒスタミンのIgE媒介性生成を低減又は防止する方法。

27. 図12 [配列番号：17-18]の「e27」に実質的に同一である配列を有してなる抗体の治療上有効量を投与することを含んでなる、哺乳動物におけるヒスタミンのIgE媒介性生成を低減又は防止する方法。

28. F(ab) [配列番号：19-20]、sFvト [配列番号：22]及びF(ab)'₂ [配列番号：24-25]からなる群から選択されるe26抗体配列フラグメントの治療上有効量を、投与を必要とする哺乳動物に投与することを含んでなる、IgEにより媒介された疾患の治療方法。

29. 図12 [配列番号：15-16]の「e26」に実質的に同一である配列を有してなる抗体の治療上有効量を、投与を必要とする哺乳動物に投与することを含んでなる、IgEにより媒介された疾患の治療方法。

30. [配列番号：15-16]からなる群から選択される配列フラグメントを有するe27抗体分子の治療上有効量を、投与を必要とする哺乳動物に投与することを含んでなる、IgEにより媒介された疾患の治療方法。

31. 図12 [配列番号：17-18]の「e27」に実質的に同一である配列を有してなる抗体の治療上有効量を、投与を必要とする哺乳動物に投与することを含んでなる、IgEにより媒介された疾患の治療方法。

【発明の詳細な説明】

改良抗IgE抗体及びポリペプチドの改良方法

発明の背景

本発明は、免疫グロブリンE (IgE)、IgEアンタゴニストヒトIgEに結合可能な抗IgE抗体、及び抗IgE抗体を含むポリペプチドを改良する方法に関する。

IgEは、広範囲にわたって病気が広がっている馴染みのある副鼻腔炎、過敏症I型、食物アレルギー及び喘息等のアレルギー反応を媒介する免疫グロブリンファミリーのメンバーである。IgEはB細胞又はBリンパ球により分泌され、その表面で発現する。IgEは、FcεRIIとして知られている低親和性IgEレセプターにそのFc領域が結合してB細胞(及び単球、好酸球及び血小板)と結合する。哺乳動物がアレルゲンに暴露されると、抗原に特異的な表面結合性IgE抗体を有するB細胞が「活性化」され、IgE分泌プラズマ細胞に発達する。次に、生じたアレルゲン特異性IgEが血流を通過して循環し、FcεRIとして知られている高親和性レセプターにより、組織中のマスト細胞及び血液中の好塩基球の表面に結合するようになる。これにより、マスト細胞及び好塩基球はアレルゲンに対して敏感になる。続いてアレルゲンに暴露されると、好塩基球及びマスト細胞のFcεRIの架橋を引き起こし、その結果、臨床的過敏症及びアナフィラキシーの原因であるヒスタミン、ロイコトリエン及び血小板活性化因子、好酸球及び好中球走化因子及びサイトカインIL-3、IL-4、IL-5及びGM-CSFが放出される。

病理的症状の過敏症は、アレルゲンが比較的多量に存在するか、又は体液及び細胞の免疫状態のレベルが高まっている場合に、結果として全体的な組織変化を生じるアレルゲン(類)に対する過度の免疫応答により特徴付けられるものである。

アナフィラキシー性過敏症における生理的变化には、肺の細気管支及び気管支の強度の収縮、平滑筋の萎縮及び毛細管の拡張が含まれ得る。しかし、この病状

の素因は、遺伝及び環境要因間の相互作用により生じられると思われる。アナフィラ

キシー性過敏症を誘発する一般的な環境アレルゲンは、花粉、食物、ハウスダスト、ダニ、動物の鱗屑、カビの孢子及び昆虫毒であることが発見されている。アトピー性アレルギーはアナフィラキシー性過敏症に関連しており、例えば喘息、アレルギー性鼻炎及び結膜炎(枯草熱)、湿疹、蕁麻疹及び食物アレルギー等の疾患を引き起こす。しかし、生命に危険性を及ぼす病状のアナフィラキシーであるアナフィラキシーショックは、通常、昆虫に刺されるか又は親の投薬 (parental medication) により誘発される。

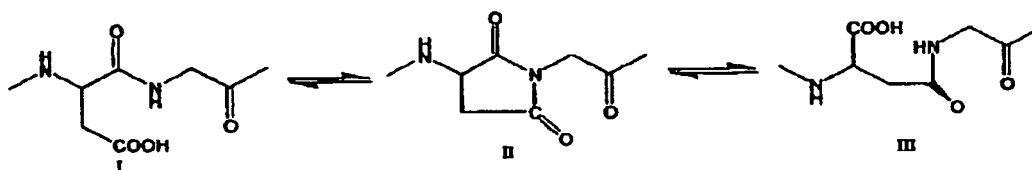
近年、過敏症Ⅰ型及びアナフィラキシー性過敏症のための治療方策として、好塩基球及びマスト細胞において見出される高親和性レセプター ($Fc\epsilon R1$) に対する結合からIgをブロックする試みがなされており、その結果、病理的症状に至るヒスタミンと他のアナフィラキシー性因子の放出が防止される。

1993年3月4日公開のWO93/04173には、IgG1残基が類似のIgE残基に置換されたヒトIgE/IgG1キメラが記載されている。本出願人の係属中出願である米国特許出願第08/405617号にはヒト化抗IgE抗体が記載されており、そこでは、ヒトIgEに対するマウス抗体 (MaE11) が、IgG1免疫グロブリンフレームワークに置換されたCDR領域 (rhumaE25) を提供するために使用されている。ヒト化技術は、Reichmanら, (1988) Nature 332:323及びJones, P. T. ら, (1986), Nature 321:522に記載されている。

マウスMaE11により誘発される免疫原性反応を起こさないでIgEに対しマウスMaE11と同様の親和性をもたらす抗IgE分子を提供するために、マウス抗体のヒト化法が確立されている (Shieldら, (1995) Int. Arch. Allergy Immunol. 107:308-312) が、MaE11又はマウス抗IgEよりも明白に良好なIgEに対する親和性を持つ抗IgEの作成は今だなされていない。

組換えモノクローナル抗体は、アスパラギン酸及びアスパラギン残基の異性化のような、全てのポリペプチド又はタンパク質に影響を及ぼす分解反応を被る。以下の図Aに示すように、-Asp-Gly-配列のアスパラギン酸残基 (I) は環状のイミド中間体 (II) を介してイソアスパラート (III) に異性化し得る

(GeigerとClarke, J. Biol. Chem. 262:785-794(1987))。アスパラギン酸(I)のカルボン酸側鎖は隣接するグリシンのアミドの窒素と反応し、環状のアスパラギン酸中間体(II)を形成し、ついで、-イソアスパラギン酸-グリシン-残基(III)になる。この反応における平衡、速度及びpH依存性は、逆相高速液体クロマトグラフィーにより分離されたペプチドモデルにおいて研究されている(OliyaiとBorchardt, Pharm Res. 10, 95-102(1993))。異性化を受ける傾向は、-Asp-Gly-配列を含む分子部分の局所的柔軟性にも依存すると考えられる(Geiger & Clarke, 上掲)。



アスパラギン酸が異性化される既知の抗体の例はrhuMa bE-25(E25)として知られている強力な抗IgE抗体である。この事象は自発的に生じ得るものであるが、E-25を37℃で21日間インキュベートすることにより、発生を誘発することもできる。最終的な結果は、抗体のポリペプチド骨格中への更なるメチル基の挿入であり、これにより高次構造が変化し結合親和性が低減する。VL32-33位に-c-Asp-Gly-及び-イソ-Asp-Gly-変異種を有するE-25の研究では、VL32残基におけるアラニン又はグルタミン酸の置換により、異性化事象を最小にすることが可能であるが、置換自体はの結果、結合性が3倍低減することが示されている。Cacia, 上掲。

よって、アスパルチル異性化の「不活性化」事象を示さないばかりか、改良されていないポリペプチドの親和性に等しいかより高い標的分子(例えば抗原)に対する親和性を示す、抗体を含む改良ポリペプチドの創製が必要とされている。

概要

本発明は、(1)異性化を起こしやすいアスパルチル残基の同定；(2)代替残基による置換と、標的分子に対する親和性についての得られた変異体のスクリーニングを含む組合わせ工程により、標的分子に対する親和性を有するポリペプチド

を改良する方法に関する。好ましい実施態様において、残基の置換方法はファージディスプレイでの親和成熟 (affinity maturation) (AMPD) である。さらに好ましい実施態様において、ポリペプチドは抗体であり、標的分子は抗原である。より好ましい実施態様において、抗体は抗 I g E であり、標的分子は I g E である。

またさらに好ましい実施態様において、本発明は、V L C D R - L 1 残基 2 7 G l n、2 8 S e r 及び 3 1 T y r を、それぞれ L y s、P r o 及び G l y に改変すると共に、V L C D R - L 1 残基 3 2 A s p を G l u で置換することにより、抗 I g E 抗体 E-2 5 の親和性を改良する方法に関する。また好ましい実施態様において、E-2 5 抗 I g E 抗体は、V H C D R 2 残基において：5 3 T h r を L y s に、5 5 A s p を S e r に、5 7 S e r を G l u に、また 5 9 A s n を L y s にする付加的な改変がなされる。

他の実施態様において、本発明は I g E に対する親和性が改良された抗 I g E 抗体に関する。

好ましい実施態様において、抗 I g E 抗体は、図 2 に「e 2 7」及び「e 2 6」と標識した配列フラグメントを有する重鎖及び軽鎖を含んでなる。あるいは、抗 I g E 抗体は、図 1 2 において「E 2 7」及び「E 2 6」と標識された全長の重及び軽鎖配列を含んでなる。

また本発明は、医薬上の有用性を有する、改良された親和性の抗 I g E 又はその機能性フラグメントの組成物にも関する。さらに本発明は、改良された親和性の抗 I g E 抗体を含有する製造品にも関する。

またさらなる他の実施態様において、本発明は I g E 媒介性のヒスタミンの生成を低減又は阻害する方法に関する。

また他の実施態様において、本発明は、本発明の抗体又はその機能性フラグメントの投与による、I g E 媒介性疾患を治療する方法に関する。

本発明の他の側面は、以下の詳細な記載及び請求の範囲により明らかになるであろう。

図面の簡単な説明

図1は、マウス抗体MAE11、重鎖サブグループIII(humIII)と軽鎖 κ サブグループI(I)のヒトコンセンサス配列及びマウスに修飾されたある種のフレームワーク残基とCDR残基を有する修飾されたヒト抗体フラグメントであるF(ab)-2フラグメント間のVH及びVLドメインの比較を示す。

図2は、rhuma25、e426、配列e26及びe27間の軽鎖及び重鎖CDRドメインの違いの配列比較を示す。ここでの残基の番号付けは、Kabataらのものとは異なり、連続的である。これらの配列はフラグメントのみであり、実際の全長重鎖及び軽鎖残基ではないことに留意されたい。

図3は、CHO 3D10細胞に発現した高親和性Fc ϵ R1の α 鎖へのFITC抱合IgEの結合を阻害する被験抗体の能力を示すFACSベースアッセイのグラフである。マウスmAbMaE11(□)、負の対照であるヒト化mAb4D5(■)、F(ab)-2(○)、F(ab)-9(●)、F(ab)-11(△)及びF(ab)-12(▲)による阻害度のパーセンテージを表す。データポイントは、1回の実験値であるmAb4D5を除き、3回の実験の平均である。この結果には、MaE11と被験F(ab)が、Fc ϵ R1 α 鎖を発現するCHO 3D10細胞に対するFITC-IgEの結合を阻害することが示されている。

図4は、CHO 3D10細胞に発現する高親和性Fc ϵ R1の α -サブユニットが負荷されたIgEに対する被験抗体の結合性を測定するFACSベースアッセイのグラフである。マウスmAbMaE11(○)、ヒト化変異体12(▲)、正の対照であるマウスmAbMaE1(●)、負の対照である抗体マウスMOPC21(△)、及び負の対照であるヒト化mAb4D5(□)による結合パーセンテージ。算術的/線形尺度によれば、0.1 μ g/mlでの平均チャンネル蛍光値は、MPOC21で7.3、MaE1で32.1、MaE11で6.4、hu4D5で4.7、及びrhuma25で1.6であった。3つのマウスmAb全てがマウスアイソタイプIgG1であり、両方のヒト化mAbはヒトアイソタイプIgG1であった。データポイントは3回の実験の平均である。この結果には、MaE11及びF(ab)-12が、Fc ϵ R1 α 鎖を発現するIgE負荷CHO 3D10細胞に結合しないことが示されている。

図5は、抗IgEのモル比対ブタクサ誘発性ヒスタミン放出の阻害度パーセン

トのグラフである。E-25 (●) と e-26 (○) が示されている。この結果には、e 26 の F (a b) 型が、44 : 1 (抗 I g E : R S I g E) の最大半減阻害モル比で用量依存的にブタクサ誘発性ヒスタミン放出を阻害する優れた阻害性を有していることが示されている。

図6は、実施例4のII部に記載された親和選択の種々のラウンド後の親和強化度をグラフで表したものである。野生型のものに対する各プールの結合強化度の比率 (E_{mut}/E_{wt}) を示す。この結果は、VLライブラリ(「a」及び「b」と表示)が、5-6回の強化ラウンド後に野生型の約10倍まで継続して改良された相対的強化度を示すことを表している。さらにVHライブラリ(「c」及び「d」)は、約3回のラウンド後に約3倍の改良性を示す。「a」はVL CDR-1残基27、28、30及び31で変異したF a b ファージライブラリに相当し、「b」は30、31、32及び34における変異体に相当し、また「c」及び「d」は残基101、102、103、105及び107で変異した独立のF (a b) ライブラリである。

図7は、実施例4のV部に記載され、それぞれe 27、e 695、e 696及びe 697と改名されたクローン235-5. 1、235-5. 2、235-5. 3及び235-5. 4におけるVH CDR2変異体と、e 26におけるVL CDR1変異体の組合せから得られた最終的な変異体の、ファージE R I S A 競合実験における、I g E 競合抗体の濃度対観測光学密度のグラフである。

図8は、実施例4のVI部に記載されたピオチンプレートアッセイにおけるe 25、e 26及びe 27抗I g E抗体の種々の濃度レベルにおける490nmでの吸光度を示すグラフである。

図9は、B I A コア T M 2 0 0 0 表面プラスモン共鳴システムにより測定された、e 25、e 26及びe 27のF (a b) 見かけ結合親和度を示す。F (a b) 抗体フラグメントの1.5倍の連続希釈物を、 $20\mu\text{l}/\text{min}$ の流量を使用し、 25°C で、PBS/トウイーンバッファー(リン酸緩衝溶液に0.05%のトウイーン20が入ったもの)中のI g Eチップ上に注入した。示された平衡解離定数(K_d)は、観測された各F a b 変異体の k_{on}/k_{off} の比として算出された。

図10は、実施例4のライブラリ特異性終止テンプレートの作成のためのテンプレートとして使用されるプラスミドp426の配列表である。

図11Aは、HER-2レセプターに対するFabヒト化抗体の軽鎖及び重鎖(可変及び定常ドメイン1)をコードしているDNAを含むプラスミドpDH188挿入断片の図である。VLとVHは、それぞれ軽鎖及び重鎖に対する可変領域である。Ckはヒトκ軽鎖の定常領域である。CH1_{cl}はヒトγ1鎖の第1定常領域である。両方のコード領域は、細菌stIIシグナル配列で始まる。

図11Bは、11Aに記載された挿入断片を含む全プラスミドpDH188の概略図である。大腸菌SR101中にプラスミドを形質転換させ、ヘルパーファージを添加した後、プラスミドをファージ粒子にパッケージする。この粒子の中には、Fab-pIII融合を示すものがある(pIIIはM13遺伝子III DNAによりコードされたタンパク質である)。

図12は、抗IgE抗体E25、E26及びE27の全長重鎖及び軽鎖残基を表す。

図13は、抗IgE抗体e26とe27のF(ab)フラグメントを表す。

図14は、抗IgE抗体e26とe27のsFVフラグメントを表す。

図15は、抗IgE抗体e26とe27のF(ab)'₂フラグメントを表す。

配列番号：1は本発明で使用され、また図10に示されている発現プラスミドe426の配列を表す。

配列番号：2は図1に示すMaE11の可変重鎖配列を表す。

配列番号：3は図1に示すF(ab)-2の可変重鎖配列を表す。

配列番号：4は図1に示すhumIIIの可変重鎖配列を表す。

配列番号：5は図1に示すMaE11の可変軽鎖配列を表す。

配列番号：6は図1に示すF(ab)-2の可変軽鎖配列を表す。

配列番号：7は図1に示すhumIIIの可変軽鎖配列を表す。

配列番号：8は図2に示すe26及びe27の可変軽鎖配列を表す。

配列番号：9は図2に示すe426の可変軽鎖配列を表す。

配列番号：10は図2に示すe25の可変軽鎖配列を表す。

配列番号：11は図2に示すe27の可変重鎖配列を表す。

配列番号：12は図2に示すe25、e26及びe426の可変重鎖配列を表す。

。

配列番号：13は図12に示すe25の全長可変軽鎖配列を表す。

配列番号：14は図12に示すe25の全長重鎖配列を表す。

配列番号：15は図12に示すe26の全長軽鎖配列を表す。

配列番号：16は図12に示すe26の全長重鎖配列を表す。

配列番号：17は図12に示すe27の全長軽鎖配列を表す。

配列番号：18は図12に示すe27の全長重鎖配列を表す。

配列番号：19は図13に示すe26とe27の可変軽鎖Fabフラグメントを表す。

配列番号：20は図13に示すe26の可変重鎖Fabフラグメントを表す。

配列番号：21は図13に示すe27の可変重鎖Fabフラグメントを表す。

配列番号：22は図14に示すe26のsFvフラグメントを表す。

配列番号：23は図14に示すe27のsFvフラグメントを表す。

配列番号：24は図15に示すe26とe27の可変軽鎖F(ab)'₂フラグメントを表す。

配列番号：25は図15に示すe26の可変重鎖F(ab)'₂フラグメントを表す。

。

配列番号：26は図15に示すe27の可変重鎖F(ab)'₂フラグメントを表す。

。

好ましい実施態様の詳細な説明

本出願において記載された特定の参考文献、特許出願及び特許は、本明細書に出典を明示して取り込まれているものとして読むべきものである。

定義：

この出願を通して使用される用語は、当業者にとって通常かつ典型的な意味に解釈されるものである。しかし、本出願人は、以下の用語については、特に以下に定義されるような定義が付与されることを望む。

「タンパク質」又は「ポリペプチド」という用語は交換可能に使用されることを意図する。それらは翻訳後修飾(例えばグリコシル化又はホスホリル化)に関係なく、ペプチド又はアミド結合により互いに結合した2又はそれ以上のアミノ酸の鎖を指す。抗体が特にこの定義の範囲内に含まれることを意図している。

本発明のポリペプチドは、各サブユニットが別々のDNA配列によりコードされた1を越えるサブユニットを含有していてもよい。

抗体ポリペプチド配列に対しての「実質的に同一」という用語は、参照ポリペプチド配列に対して少なくとも70%、好ましくは80%、さらに好ましくは90%、最も好ましくは95%の配列同一性を示す抗体であると解釈されるべきものである。核酸配列に対してのこの用語は、参照核酸配列に対して少なくとも約85%、好ましくは90%、さらに好ましくは95%、最も好ましくは97%の配列同一性を示すヌクレオチド配列であると解釈されるべきである。ポリペプチドに対して、比較配列の長さは一般的に少なくとも25アミノ酸である。核酸に対しては、その長さは一般的に少なくとも75ヌクレオチドである。

「同一性」又は「相同性」という用語は、配列を整列させ、配列全体に対してける最大のパーセント同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保守的置換も配列同一性の一部と考えないとした、比較される対照配列の残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージを意味するものと解釈されるべきものである。N末端もしくはC末端の伸長も挿入も何れも同一性あるいは相同性を低減ささせるものではないと解釈される。アラインメントのためのコンピュータプログラム及び方法は従来からよく知られている。配列同一性は配列分析ソフトウェア(例えばSequence Analysis Software Package, Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Ave., Madison, WI 53705)を使用して測定することができる。このソフトウェアは、種々の置換、欠失及び他の修飾に対して相同性の程度を割り当てることにより、類似の配列をマッチングさせる。

「抗体」という用語は広義に使用され、具体的には、モノクローナル抗体(全長モノクローナル抗体を含む)、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体(例えば二

重特異性抗体)、及びそれらが所望の生物活性を示す限り抗体フラグメント(例えばFab、F(ab')₂及びFv)も包含している。抗体(Ab)及び免疫グロブリン(Ig)は同一の構造的特徴を有する糖タンパク質である。抗体は特定の抗原に対して結合特異性を示すが、免疫グロブリンは抗体及び抗原特異性を欠く他の抗体様分子の両方を含む。後者の種類のポリペプチドは、例えばリンパ系では少量しか生産されず、骨髄腫により多くの量が生産される。

天然の抗体と免疫グロブリンは、2つの同一の軽(L)鎖と2つの同一の重(H)鎖からなり、通常約150000ダルトンのヘテロテトラマー糖タンパク質である。各軽鎖は共有シスルフィド結合により重鎖に結合しており、ジスルフィド結合の数は異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間で変動する。また、各重鎖及び軽鎖は、規則的に間隔が開いた鎖内ジスルフィド架橋を有している。各重鎖は一端に可変ドメイン(VH)を有し、これに複数の定常ドメインが続いている。各軽鎖は一端に可変ドメイン(VL)を、他の末端に定常ドメインを有している。軽鎖の定常ドメインは、重鎖の第1定常ドメインと整列しており、軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列している。特定のアミノ酸残基が、軽鎖及び重鎖の可変ドメイン間の界面を形成していると考えられている(Clothiaら, J. Mol. Biol. 186, 651-66, 1985) : NovotnyとHaber, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82, 4592-4596 (1985)。

「単離された」抗体とは、それが生成された環境の成分から同定され分離及び／又は回収されたものである。その生成環境の汚染成分とは、抗体の診断又は治療への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、抗体は、少なくとも3種の方法により測定可能になるまで精製される：すなわち1) ローリー (Lowry) 法により測定して抗体の95重量%、最も好ましくは99重量%を越えるまで；2) スピニングカップシークエネーターを使用することにより、N末端あるいは内部アミノ酸配列の少なくとも15の残基を得るのに十分な程度まで；あるいは3) クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEによる均一性が得られるまで、精製される。抗体の

自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないため、単離された抗体には、組換え細胞内のインシトゥー抗体が含まれる。しかしながら、単離された抗体は少なくとも一つの精製工程により調製される。

「種依存性抗体」、例えば哺乳動物抗ヒトIgE抗体は、第1の哺乳動物種からの抗原に対する方が、第2の哺乳動物種からのその抗原の相同体に対するよりもより強い結合親和性を有する抗体である。通常、種依存性抗体は、ヒト抗原に「特異的に結合する」(すなわち、わずか約 1×10^{-7} M、好ましくは約 1×1

10^{-8} M、最も好ましくは約 1×10^{-9} Mを越えない結合親和性(Kd)値を有する)が、ヒト抗原に対する結合親和性よりも、少なくとも約50倍、又は少なくとも約500倍、又は少なくとも約1000倍弱い第2の非ヒト哺乳動物種からの抗原の相同体に対する結合親和性を有する。種依存性抗体は、上述の種々のタイプの抗体の何れであってもよいが、好ましくはヒト化又はヒト抗体である。

「抗体変異体」という用語は、アミノ酸残基の一又は複数が修飾されている、抗体のアミノ酸配列変異体を指す。このような変異体は、必ず、抗体の重鎖又は軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列と少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは85%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%のアミノ酸配列同一性又は類似性を有するアミノ酸配列と100%未満の配列同一性又は類似性を有する。本発明の方法は、ポリペプチド、抗体及びそれらのフラグメントの双方に等しく適用されるため、これらの用語は時に交換可能に使用される。

抗体の可変ドメインに対して「可変」なる用語は、可変ドメインのある部分が抗体間の配列において広範に異なることを指し、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合性と特異性において使用される。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメインにわたって均一には分布していない。それは、軽鎖及び重鎖可変ドメインの両方において高頻度可変領域としても知られている相補性決定領域(CDR)と呼ばれる3つのセグメントに濃縮される。CDRを決定する少なくとも2つの方法がある：(1)交雑種配列可変性に基づくアプローチ(すなわち、Kabatら, Sequences of Proteins of Immunological Interest National Institute of

Health, Bethesda, MD1987) ; 及び(2) 抗原-抗体複合体の結晶学的研究に基づくアプローチ (Chothia, C. ら, (1989), *Nature* 342:877) である。本出願人の抗 I g E 抗体に対しては、ある C D R を、Kabat ら及び Chothia らのアプローチを組合せることにより決定した。可変ドメインのより高度に保存されている部分はフレームワーク (F R) と呼ばれる。未変性の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、主に β シート立体配置を採用し、3つの C D R により連結された4つのFR領域をそれぞれ含み、これが、 β シート構造を結合し、ある場合にはその一部を形成するループを形成する。各鎖の C D R は F R 領域に非常に近接して一緒に保持されており、他の鎖

の C D R と共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している (Kabat ら参照)。定常ドメインは抗原に対する抗体の結合性に直接関与していないが、種々のエフェクター機能、例えば抗体の抗体依存性細胞毒性への関与を示す。

「抗体フラグメント」は、全長抗体の一部、一般的にはその抗原結合又は可変領域を指す。抗体フラグメントの例には、F a b、F a b'、F (a b')₂ 及び F v フラグメントが含まれる。抗体のパパイン消化は、F a b フラグメントと呼ばれ、各々が単一の抗原結合部位を有する2つの同一の抗原結合フラグメントと、容易く結晶化するその能力によりそのように呼ばれる残りの F c フラグメントをつくり出す。ペプシン処理により、抗原を架橋することが可能な2つの抗原結合部位を有する F (a b')₂ フラグメントと残りの他のフラグメント (p F c' と称される) が得られる。更なるフラグメントには、ダイアボディ、線形抗体、単鎖抗体分子、及び抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体が含まれる。ここで使用される場合、抗体に関して「機能的フラグメント」とは、F v、F (a b) 及び F (a b')₂ フラグメントを指す。

「F v」フラグメントは、完全な抗原認識及び結合部位を含む最小抗体フラグメントである。この領域は、密接な非共有結合による一つの重鎖及び一つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる (V_H-V_L 二量体)。この配置において、各可変ドメインの3つの C D R は相互に作用して V_H-V_L 二量体の表面に抗原結合部位を形成する。集合的に、6つの C D R が抗体に抗原結合特異性を付与する。しかし

ながら、単一の可変ドメイン(又は抗原に対し特異的な3つのCDRを含むFvの半分)でさえ、結合部位全体よりも親和性が低くなるが、抗原を認識し結合する能力を有している。

Fabフラグメント[F(ab)とも称される]は、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第一定常領域(CH1)もまた含む。Fab'フラグメントは、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含む重鎖CH1領域のカルボキシル末端に数個の残基が付加している点においてFab断片とは異なる。Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を持つFab'に対するここでの名称である。F(ab')フラグメントは、F(ab')₂のペプシン消化生成物のヒンジシステインでジスルフィド結合を開裂させることにより生成される。抗体フ

ラグメントの更なる化学的カップリングが当業者に知られている。

任意の脊椎動物種由来の抗体(免疫グロブリン)の軽鎖には、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ(κ)及びラムダ(λ)と呼ばれる2つの明確に区別されるタイプの一つが充当される。

重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に依存して、「免疫グロブリン」を異なるクラスに割り当てることができる。免疫グロブリンには、少なくとも5つの主たるクラス:IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMがあり、それらのいくつかはさらにサブクラス(アイソタイプ)、例えばIgG-1、IgG-2、IgG-3及びIgG-4; IgA-1及びIgA-2に分割される。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及び μ と呼ばれる。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造と3次元構造はよく知られている。本発明における使用に好適な免疫グロブリンは免疫グロブリンEである。

ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指す、すなわち、集団を構成する個々の抗体が、少量存在しうる自然に生じる可能な突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、一つの抗原部位に対応する。更に、異なる決定基(エ

ピトープ)に対応する異なる抗体を典型的に含む通常の(ポリクローナル)抗体とは異なり、各モノクローナル抗体は抗原の単一の決定基に対応する。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の免疫グロブリンによって汚染されていないハイブリドーマ培養から合成される点で有利である。「モノクローナル」との形容は、実質的に均一な抗体集団から得られたという抗体の特徴を示し、抗体を何か特定の方法で生産しなければならないことを意味するものではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、最初にKohler及びMilstein, *Nature* 256, 495 (1975)に掲載されたハイブリドーマ法によって作ることができ、あるいは例えば米国特許第4816567号に記載されているような組換え法によって作ることができる。本発明で使用されるモノクローナル抗体は、Clacksonら, *Nature* 352:624-628 (1991)、及びMarksほか, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991)に記載された技術を用いてファージ抗体ライブラリから単離してもよい。

ここで、モノクローナル抗体は、重鎖及び／又は軽鎖の一部が特定の種由来の抗体あるいは特定の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一であるか相同であり、鎖の残りの部分は他の種由来の抗体あるいは他の抗体クラスあるいはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一であるか相同である「キメラ」抗体(免疫グロブリン)、並びにそれが所望の生物活性を有する限りそれら抗体のフラグメントを特に含む(米国特許第4816567号);Morrisonほか, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:6851-6855 (1984))。

非ヒト(例えばマウス)抗体の「ヒト化」形とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖あるいはそれらのフラグメント(例えばFv、Fab、Fab'、F(ab')₂あるいは抗体の他の抗原結合サブ配列)であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。大部分においてヒト化抗体はレシピエントの相補性決定領域(CDR)の残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト(ドナー抗体)のCDRの残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域残基は、対応する非ヒト残基によっ

て置換される。更に、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたCDRもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでもよい。これらの修飾は抗体の特性を更に洗練し、最適化するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいはほとんど全てのCDR領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいはほとんど全てのFR領域がヒト免疫グロブリン共通配列のものである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、最適には免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含んでなる。更なる詳細は、Jonesら, *Nature* 321, 522-525 (1986) ; Reichmanら, *Nature* 332, 323-329 (1988) 及びPresta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2, 593-596 (1992) を参照のこと。

「単鎖Fv」すなわち「sFv」抗体フラグメントは、抗体のVH及びVLドメインを含有し、これらのドメインはポリペプチド単鎖に存在する。一般的に、Fvポリペプチドは、sFvが抗体結合のための所望の構造を形成できるように、VHとVLドメインとの間にポリペプチドリンカーを更に含んでいる。sFvに

についてのレビューには、例えば、Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Mooreeds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994) を参照されたい。

「ダイアボディ」なる用語は、二つの抗原結合部位を持つ小さい抗体フラグメントを指し、そのフラグメントは同一のポリペプチド鎖(VH-VL)内で軽鎖可変ドメイン(VL)に重鎖可変ドメイン(VH)が結合している。非常に短いために同一鎖上で二つのドメインの対形成が可能ではないリンカーを使用して、ドメインを他の鎖の相補ドメインと強制的に対形成させ、二つの抗原結合部位を創製する。ダイアボディは、例えば、欧州特許第404097号：国際公開第93/11161号、及びHollingerら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993) に更に詳細に記載されている。

抗体の「機能的フラグメント又は類似体」という用語は、全長抗体と共通の質的生物学活性を有する化合物である。例えば抗IgE抗体の機能的フラグメント又は類似体は、高親和性レセプター、FcεRIに結合する能力を有する分子

から、このような能力を妨げる又は実質的に低減させるような形で、IgE免疫グロブリンに結合可能なものである。

「アミノ酸」及び「アミノ酸類」という用語は、天然に生じる全てのL- α -アミノ酸を指す。アミノ酸はA部：抗体の調製：(i v)変異体抗体の生成の元に以下に記載されるようにして同定される。「アミノ酸変異体」という用語は未変性のアミノ酸配列と比べてそのアミノ酸配列中に幾らかの差異がある分子を指す。

「置換」変異体は、未変性配列の少なくとも1つのアミノ酸残基が除去され、同じ部位に異なるアミノ酸が代わって挿入されたものである。置換には、分子内の1つのアミノ酸のみが置換された単一置換のものと、あるいは同じ分子において2又はそれ以上のアミノ酸が置換された多置換がある。「挿入」変異体は、未変性配列の特定の位置のアミノ酸に直ぐに隣接して一又は複数のアミノ酸が挿入されたものである。アミノ酸に直ぐに隣接してとは、アミノ酸の α -カルボキシル又は α -アミノ官能基のいずれかに結合していることを意味する。「欠失」変異体は、未変性配列の一又は複数のアミノ酸が除去されたものである。通常、欠失変異体は、分子の特定領域において1又は2のアミノ酸が欠失される。

「細胞」、「株化細胞」及び「細胞培養」なる用語は相互に交換可能に用いられ、これら全ての表記には子孫が含まれる。また、全ての子孫は意図的な突然変異あるいは意図せざる突然変異のために、完全に同一のDNAを有するわけではないことも理解される。最初に形質転換した細胞に対してスクリーニングされたものと同じ機能あるいは生物学的性質を有する突然変異子孫も含まれる。

本発明で使用される「宿主細胞」は原核生物又は真核生物宿主である。適切な宿主細胞の例は、B部ベクター、宿主細胞及び組換え方法：(v i i)宿主細胞の選択及び形質転換に記載する。

「形質転換」とは、DNAが、染色体外エレメントとしてであれ染色体統合によってであれ、複製可能であるように生物体にDNAを導入することを意味する。

「トランスフェクション」とは、コード配列が実際に発現しようとしまいと、宿主細胞に発現ベクターが取り込まれることを指す。

「トランスフェクトされた宿主細胞」及び「形質転換された」という用語は、細胞内へのDNAの導入を指す。細胞は「宿主細胞」と称され、原核生物でも真核生物でもよい。典型的な原核生物の宿主細胞には大腸菌の様々な菌株が含まれる。典型的な真核生物の宿主細胞は哺乳動物、例えばチャイニーズハムスターの卵巣細胞又はヒト由来の細胞である。導入されるDNA配列は、宿主細胞と同じ種からのものでも宿主脂肪とは異なる種からのものでもよく、あるいはある外来性又はある相同的DNAを含むハイブリッドDNA配列であってもよい。

「複製可能な発現ベクター」及び「発現ベクター」という用語は、外来性DNA片が挿入された、通常は二本鎖のDNA片を指す。外来性DNAとは、宿主細胞中に自然には見い出せない異種性DNAと定義される。ベクターは適切な宿主細胞中に外来性または異種性DNAを輸送するために使用される。一度宿主細胞に入れば、ベクターは宿主の染色体DNAとは無関係に複製され、いくつかベクターのコピーとそれが挿入された(外来性)DNAが産生される。

「ベクター」という用語は、適切な宿主におけるDNAの発現をなし得る適切な調節配列に作用可能に結合しているDNA配列を含むDNA作成物を意味する。このような調節配列には、転写を行うプロモータ、そのような転写を調節する任意のオペレータ配列、適切なmRNAリボソーム結合部位をコードする配列、転

写及び翻訳の終結を調節する配列が含まれる。ベクターは、プラスミド、ファージ粒子、又は単に潜在的ゲノム挿入物であってよい。適切な宿主中でひとたび形質転換されると、ベクターは複製されて、宿主のゲノムとは無関係に機能し、あるいはいくつかの例においては、ゲノム自体に統合される。本明細書において、プラスミドが現在最も一般的に使用されるベクターの形態であるため、「プラスミド」と「ベクター」とはしばしば互換的に使用される。しかしながら、本発明は、従来のもものと等価な機能をもたらす、従来から知られている、あるいは知られるようになるベクターの他の形態も含むものである。例えば、哺乳動物の細胞培養発現に対する典型的な発現ベクターは、pRK5 (欧州特許第307247号)、pSV16B (国際公開第91/08291号) 及びpVL1392 (Pharmi

ngen) である。

「リポソーム」は、薬剤(例えば、ここで開示されている抗体変異体と、場合によっては化学療法薬)の哺乳動物への送達に有用な様々なタイプの脂質、リン脂質及び／又は界面活性剤からなる小胞体である。リポソームの成分は、通常、生物膜の脂質配置に似た2層構造に配されている。

「調節配列」という用語は特定の宿主生物中における作動可能に結合させたコード配列の発現に必要なDNA配列を指す。例えば原核生物に適する調節配列は、プロモーター、任意にはオペレーター配列、及びリボソーム結合部位を包含する。真核細胞はプロモーター、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサーを利用することが知られている。

「単離された」核酸分子は、抗体核酸の天然源に通常は伴っている少なくとも1つの汚染核酸分子から同定され分離された核酸分子である。単離された核酸分子は天然に見出される形態あるいは様相以外のものである。ゆえに、単離された核酸分子は、天然の細胞中に存在する核酸細胞とは区別される。しかし、単離された核酸分子は、例えば、核酸分子が天然の細胞の場合とは異なった染色体位置にある抗体を通常発現する細胞に含まれる核酸分子を含む。

核酸が別の核酸配列に対して機能的関係に置かれている場合にそれは「作用可能に結合」されている。これは、適切な分子(例えば、転写アクチベータータンパク質)が調節配列(群)に結合している場合に遺伝子発現を可能にするように連結

された調節配列及び遺伝子である。例えば、プレ配列または分泌リーダーのためのDNAは、ポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現される場合には、ポリペプチドのDNAに作用可能に連結されている；プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を与える場合、コード配列に作用可能に連結されている；あるいはリボソーム結合部位は、配列の転写に影響を与える場合、コード配列に作用可能に連結されている；又はリボソーム結合部位は、翻訳を容易にするように配置されている場合、コード配列に作用可能に連結されている。一般的に、「作用可能に連結された」とは、連結されているDNA配列が連続し

ており、分泌リーダーの場合、それは連続しており、かつ読みフェーズにあることを意味する。しかし、エンハンサーは連続していなくてもよい。結合は、好都合な制限部位での連結により達成される。そのような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプター又はリンカーが通常の実施にしたがって用いられる。

「処置」とは、治療的処置及び予防又は防止方法の両方を指す。処置の必要があるものには、既に疾患にかかっているもの並びに疾患を予防すべきものが含まれる。

「疾患」は、ポリペプチドでの処置により恩恵を得るあらゆる症状のことである。これには、慢性及び急性の疾患又は当該疾患に対する素因を哺乳動物に与える病理的状态を含む病気が含まれる。

治療の補助のためにここで使用される「免疫抑制剤」という用語は、移植片が移植される宿主の免疫系を抑制又はマスクするように作用する物質を指す。これにはサイトカインの生成を抑制し、自己抗原の発現をダウンレギュレート又は抑制し、あるいはMHC抗原をマスクする物質が含まれる。このような抗原の例には、2-アミノ-5-アリール-5-置換ピリミジン(米国特許第4665077号を参照)、アザチオプリン(又はアザチオプリンに対する有害反応の場合はシクロホスファミド)；プロモクリプチン；(米国特許第4120649号に記載されているように、MHC抗原をマスクする)グルタルアルデヒド；MHC抗原に対する抗イディオタイプ抗原及びNHCフラグメント；シクロスポリンA；ステロイド類、例えばグルココルチコステロイド、例えばブレドニゾン、メチルプレドニゾン、

及びデキサメサゾン；抗インターフェロン- γ 、- β 又は α 抗体を含むサイトカイン又はサイトカインレセプターアンタゴニスト；抗腫瘍壊死因子- α 抗体；抗腫瘍壊死因子- β 抗体；抗インターロイキン-2抗体及び抗IL-2レセプター抗体；抗L3T4抗体；異種性抗リンパ球グロブリン；万能(pan)T抗体、好ましくは抗CD3又は抗CD4/CD4a抗体；LFA-3結合ドメインを含む可溶性ペプチド(1990年7月26日に公開された国際公開第90/08187号)；ストレプト

キナーゼ；TGF- β ：ストレプトドルナーゼ；宿主からのRNA又はDNA；FK506；RS-61443；デオキシスペルグアリン (deoxyspergualin)；ラパマイシン；T細胞レセプター (米国特許第5114721号)；T細胞レセプターフラグメント (Offinerら, Science 251:430-432 (1991)；国際公開第90/11294号；及び国際公開第91/01133号)；及びT細胞レセプター抗体 (欧州特許第340109号)、例えばT10B9が含まれる。これらの抗原は、CD11a抗体と同時に又は別々の時間に投与され、当該分野で示されている量と同じか少ない投与量で使用される。好ましい補助免疫抑制剤は、実施する移植のタイプを含む、処置される疾患のタイプを含む多くの要因並びに患者の病歴に依存するが、一般的かつ全体的に好ましいものは、シクロスポリンA、グルココルチコステロイド (最も好ましくはプレドニゾン又はメチルプレドニゾン)、OKT-3モノクローナル抗体、アザチオプリン、プロモクリプチン、異種性抗リンパ球グロブリン、又はそれらの混合物から薬剤を選択することである。

「癌」及び「癌性」という用語は、典型的には調節されない細胞成長を特徴とする、哺乳動物における生理学的状態を指すか記述する。癌の例には、これらに限定されるものではないが、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、及び白血病が含まれる。このような癌のより特定の例には、扁平上皮細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、胃腸癌、膵臓癌、神経膠芽細胞腫、子宮頸管癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝腫瘍、乳癌、大腸癌、結腸直腸癌、子宮体癌、唾液腺癌、腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、肛門癌、甲状腺癌、肝癌 (hepatic carcinoma) 及び様々な種類の頭部及び頸部の癌が含まれる。

治療の目的とされる「哺乳動物」とは、ヒト、家庭用又は畜産用動物、非ヒト霊長類、及び動物園、スポーツ又はペット用動物、例えばイヌ、ウマ、ネコ及び

ウシ等を含む、哺乳動物として分類されるあらゆる動物を指す。

「エピトープタグ」なる用語は、ここで用いられるときは、「エピトープタグ」に融合したポリペプチドを指す。エピトープタグポリペプチドは、その抗体が産生され得るエピトープを提供するのに十分な数の残基を有しているが、その長さはポリペプチドの活性を阻害しないよう十分に短い。また、エピトープタグは

、好ましくは、抗体が他のエピトープと実質的に交差反応をしないようになり独特である。適切なタグポリペプチドは、一般に、少なくとも6のアミノ酸残基、通常は約8～50のアミノ酸残基(好ましくは約9～30の残基)を有する。具体例には、HAタグポリペプチド及びその抗体12CA5(Fieldら, Mol. Cell Biol. 8:2159-2165(1988)) : c-mycタグ及びそれに対する8F9、3C7、6E10、G4、B7及び9E10抗体(Evanら, Mol. Cell Biol. 5(12):3610-3616(1985)) ; 及び単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D(gD)タグ及びその抗体(Paborskyら, Protein Engineering 3(6):547-553(1990))が含まれる。ある実施態様において、エピトープタグは「サルベージレセプター結合エピトープ」である。

「サルベージレセプター結合エピトープ」は、ここで使用されるときは、IgG分子のインビボでの血清半減期を増加させる原因となるIgG分子(例えばIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4)のFc領域のエピトープを指す。

ここで使用される「細胞障害剤」という用語は、細胞機能を抑制又は阻害するか、及び／又は細胞の崩壊を引き起こす物質を指す。この用語は放射性同位元素(例えばI¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰及びRe¹⁸⁶)、化学療法剤、毒素、例えば細菌、真菌、植物または動物由来の酵素活性毒又はそれらのフラグメントを含むことを意図している。

「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化学化合物である。化学療法剤の例には、アドリマイシン(Adrimycin)、ドキソルビシン、5-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド([Ar a-C])、シクロホスファミド、チオテパ、タキソテール(ドセタキセル)、ブスルファン、シトキン(Cytosin)、タキソール、メトトレキサート、シスプラチン、メルファラン、ビンブラスチン、ブレオマイシン、エトポシド、イホスファミド、マイトマイシンC、ミトキサントロン、ビンクリスチン、

ビノレルビン(Vinorelbine)、カルボプラチン、テニボシド(Teniposide)、ダウノマイシン、カルミノマイシン(Carminomycin)、アミノプテリン、ダクチノマイシン、マイトマイシン、エスペラミシン(Esperamicins) (米国特許第46751

87号参照)、メルファラン、及び他の関連ナイトロジェンマスタードが含まれる。

本出願で使用される「プロドラッグ」という用語は、親薬物に比べて、腫瘍細胞に対する細胞毒性が低く、より活性な親形態に酵素的に活性化又は転換することのできる、製薬的に活性な先駆物質又は誘導体を指す。例えば、Wilman, 「Prodrugs in Cancer Chemotherapy」, Biochemical Society Transactions, 14, p. 375-382, 615 Meeting, Belfast (1986) 及びStellaら, (ed.), 「Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery」, Directed Drug Delivery, Borc hardtら, (ed.), pp. 247-267, Human Press (1985) を参照。限定するものではないが、本発明のプロドラッグには、ホスファート含有プロドラッグ、チオホスファート含有プロドラッグ、スルファート含有プロドラッグ、ペプチド含有プロドラッグ、Dアミノ酸含有プロドラッグ、グルコシル化プロドラッグ、 β ラクタム含有プロドラッグ、任意に置換されたフェノキシアセトアミド含有プロドラッグ又は任意に置換されたフェニルアセトアミド含有プロドラッグ、5-フルオロシトシン、及びより活性のある細胞毒のない薬物に転換可能な他の5-フルオロウリジンプロドラッグが含まれる。限定するものではないが、本発明で使用されるプロドラッグ形態に誘導体化可能な細胞毒薬剤の例には、上述の化学療法剤が含まれる。

ここで使用される場合の「標識」という単語は、抗体に直接又は間接的に抱合される検出可能な化合物又は組成物を指す。標識はそれ自体を検出可能であるか(例えば、放射性同位元素標識又は蛍光標識)、又は酵素的標識の場合は、検出可能な基質化合物又は組成物の化学的变化を触媒してもよい。

ここで使用される場合の「固相」とは、本発明の抗体が付着し得る非水性のマトリックスを意味する。ここで包含される固相の例には、ガラス(例えば調整穴あきガラス)、多糖類(例えばアガロース)、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコール及びシリコーンにより、部分的に又は全体的に形成されるものが含まれる。ある実施態様において、文脈に関連して、固相にはアッセ

イプレートのウェルが含まれ；他の場合は固相は精製カラムである(例えば、ア

フィニティークロマトグラフィーカラム)。またこの用語は、分離した粒子からなる不連続な固相、例えば米国特許第4275149号に記載されているものも含む。

ここで使用される抗ヒトIgE抗体とは、高親和性レセプターであるFcεRIに対するIgEの結合を阻害するか又は実質的に低減させるように、ヒトIgEに結合する抗体を意味する。好ましくは、この抗IgE抗体はE-25である。

ここで使用される場合の「IgE媒介性疾患」という用語は、免疫グロブリンIgEに対する過感受性及び／又は過剰産生により特徴付けられる状態又は疾患を意味する。特に、喘息、アレルギー性鼻炎及び結膜炎(枯草熱)、湿疹、蕁麻疹及び食物アレルギー等を含む、アナフィラキシー性感覚過敏症及びアトピー性アレルギーに関連した状態を含むと解釈すべきである。しかし、通常、蛇又は蜂に刺されるか、親の投薬に起因するアナフィラキシーショックといった深刻な病状もこの用語の範囲に含まれる。

ここで使用される場合の「ファージディスプレイを用いた親和成熟」(AMPD)とはLowmanら, *Biochemistry* **30** (45):10832-10838 (1991) に記載された方法を指し；またHawkinsら, *J. Mol Biol.* **254**:889-896 (1992) も参照される。以下の記載に厳密に制限されるものではないが、この方法は簡単には次のように記載することができる:いくつかの高頻度可変領域部位(例えば6-7部位)の各部位を変異させて各部位に全ての可能なアミノ酸置換を生じさせる。このようにして産生された抗体変異体は、各繊維状ファージ粒子内にパッケージされたM13の遺伝子II産物への融合体として該繊維状ファージ粒子から一価の形で表示される。種々の変異体を発現するファージが、結合選択のラウンドを通して循環され、続いて高親和性を示す変異体が単離され、配列決定される。この方法は、また1992年6月11日に発行された国際公開第92/09696号にも記載されている。プールされたアフィニティディスプレイを含む変更手順は、Cunningham, B. C. ら, *EMBO J.* **13** (11), 2508-2515 (1994) に記載されている。

本方法は、a) ポリペプチドをコードする第1の遺伝子と天然又は野生型ファージコートタンパク質の少なくとも一部をコードする第2の遺伝子で、第1及び

第2の遺伝子が異種性であるもの、及び第1及び第2の遺伝子に作動可能に結合し、

よって融合タンパク質をコードする遺伝子融合体を形成する転写調節エレメントを含有する複製可能な発現ベクターを作成し；b) 第1の遺伝子内の一又は複数の選択された位置でベクターを変異させて、関連プラスミドのファミリーを形成し；c) プラスミドで適切な宿主細胞を形質転換させ；d) ファージコートタンパク質をコードする遺伝子を有するヘルパーファージを、形質転換した宿主細胞に感染させ；e) プラスミドの少なくとも一部を含有する組換えファージミド粒子を形成し、宿主の形質転換を可能にする適切な条件下で、形質転換した感染宿主細胞を培養し、該条件は、少量のファージミド粒子が、粒子の表面に融合タンパク質の複製を1を越えて示すように調節されるものであり；f) ファージミド粒子の少なくとも一部が標的分子に結合するように、ファージミド粒子を標的分子に接触させ；g) 結合しなかったものから結合したファージミド粒子を分離する、ことを含む新規の結合ポリペプチドの選択方法を提供する。好ましくは、本方法は、標的分子に結合する組換えファージミド粒子で適切な宿主細胞を形質転換させ、工程d) からg) を一又は複数繰り返すことを含む。

また、本方法は、1以上のサブユニットからなるポリペプチドを含有し、ここで関心あるサブユニットをコードするDNAに作用可能に結合している転写調節エレメントを含有する複製可能な発現ベクターがファージコートタンパク質に融合される。

ここで使用される場合の「抗体ファージライブラリ」という用語は、前掲のHawkinsら、J. Mol Biol. 254:889-896 (1992)、及びLowmanら、Biochemistry 30 (45):10832-10838 (1991)に記載された親和成熟プロセスに使用されるファージライブラリを指す。各ライブラリは、全ての可能なアミノ酸置換が生じる高頻度可変領域(例えば、6-7部位)を含有する。このようにして生成された抗体変異体は、ファージの外で発現し、繊維状ファージ粒子内にパッケージされるM13の遺伝子産物への融合体として、該粒子から一価の形で表示される。

ここで使用される場合の「室温」又は「雰囲気温度」は23～25℃であるべ

きである。

ここで使用される場合の「結合ポリペプチド」とは、標的分子にする選択可能な親和性で結合する任意のポリペプチドを意味する。好ましくはポリペプチドは

タンパク質であり、最も好ましくは約100を越えるアミノ酸残基を含有するものである。典型的には、ポリペプチドはホルモン又は抗体又はそれらのフラグメントである。

ここで使用される場合の「高親和性」とは、親和定数(K_d)が、生理学的条件下で、 $<10^{-5}$ M、好ましくは $<10^{-7}$ Mであることを意味する。

ここで使用される場合の「標的分子」とは、抗体又はリガンドの生成が望まれているタンパク質には限らない任意の分子を意味する。しかし、好ましくは標的はタンパク質であり、最も好ましくは、標的は抗原である。しかし、レセプター、例えばホルモンレセプターが、特にこの用語の範囲内に含まれるべきである。

ここで明らかなIgE、変異体IgE分子及びキメラIgE分子の特定の部分に対応するペプチドのアミノ酸番号付けを含む、ここで使用される場合の、免疫グロブリンアミノ酸残基の番号付けは全て、Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health, Bethesda, MD 1987)の免疫グロブリンアミノ酸残基番号付けに従い行う。

発明の実施の形態

I. 標的分子の親和性を改良する方法

A. 異性化可能なアスパルチル残基の同定

本発明の実施において、異性化する傾向のある異性化可能なアスパルチル残基の同定は、通常、当業者に公知の任意の技術によりなされる。例えば、Cacelaら、Biochemistry 35, 1897-1903 (1996)には、抗IgE抗体であるE-25 (-Asp-Gly-残基を含有)を37℃で21日間インキュベートする方法が記載されている。異性化した-Asp-Gly-の同定は、未処理又はプロテアーゼで処理されたフラグメントの質量分析及びクロマトグラフィーによりなされる。また異性化はアスパラギン残基で生じることが報告されているため(T. GeigerとS. Clarke, J. Biol. Chem. 262 (2), 785-794 (1987))、本発明では、系統的評価及びア

スパラギニル残基を含有するポリペプチドの改良も、好ましく行われる。

B. 標的分子の親和性を改良する代替残基の選択

レセプター親和性を最適化する多くの技術が、当業者に利用可能である。典型的には、これらの技術は、全て、関心のある部位で種々のアミノ酸残基を置換し、

続いて変異ポリペプチドのレセプター親和性のスクリーニング分析することを含む。本発明での使用に好適な技術はファージディスプレイ (Hawkinsら, J. Mol Biol. 254:889-896 (1992) ; Lowmanら, Biochemistry 30 (45):10832-10838 (1991)) を使用する親和成熟である。簡単には、いくつかの高頻度可変領域部位 (例えば 6-7 部位) を変異させて、各部位に全ての可能なアミノ酸置換を生じさせる。このようにして生成された抗体変異体を、繊維状ファージ粒子内にパッケージされる M13 の遺伝子産物への融合体として、該繊維状ファージ粒子から一価の形で表示する。種々の変異体が発現するファージを、結合選択のラウンドを通して循環し、続いて高親和性を示す変異体を単離し、配列決定する。

新規の結合ポリペプチドを選択する方法は、構造的に関連しているポリペプチドのライブラリを好ましくは利用する。ファージコートタンパク質に融合した、構造的に関連したポリペプチドのライブラリは、変異誘発により生成され、好ましくは、各関連ポリペプチドの単一の複製が、該ポリペプチドをコードする DNA を含有するファージミド粒子の表面に示される。ついで、これらのファージミド粒子を標的分子に接触させ、標的に対し最も高い親和性を有する粒子がより低い親和性のものから分離される。ついで、高親和性のバインダーを細菌宿主に感染させて増幅させ、競合結合工程を繰り返す。本方法を所望の親和性のポリペプチドが得られるまで繰り返す。

あるいは、ランダムな点変異を発現させるために (誤りがちな DNA ポリメラーゼを使用することにより生じる)、多価ファージ (McCaffertyら, (1990), Nature 348, 552-554; Clacksonら, (1991), Nature 352, 624-628) を使用することができ、ついで抗原に対する親和性によりスクリーニングされるファージ抗体フラグメントのライブラリが作製される。Hawkinsら, (1992) J. Mol Biol. 254:889-89

6。

好ましくは、親和成熟プロセス中、複製可能な発現ベクターを転写調節エレメントのタイトなコントロール下におき、培養条件をファージミド粒子表面における融合タンパク質の複製が1を越えて示す該粒子の量又は数が、約1%未満になるように調節される。また好ましくは、融合タンパク質の複製を1を越えて示すファージミド粒子の量は、融合タンパク質の複製を1つだけ示すファージミド粒子の量の10%未満である。最も好ましい量は20%未満である。

典型的には、本発明の方法において、発現ベクターは、ポリペプチドの各サブユニットをコード化したDNAに融合される分泌シグナル配列をさらに含み、転写調節エレメントはプロモータ系である。好ましいプロモータ系はLacZ、 λ pL、TC、T7ポリメラーゼ、トリプトファン、及びアルカリ性ホスファターゼプロモータ及びそれらを組合せたものから選択される。

また、典型的には、第1の遺伝子は哺乳動物のタンパク質をコードするものであり、好ましくはタンパク質は抗IgE抗体である。付加的な抗体は、セクションII.A. 抗体の調製、(vi) 多重特異性抗体(しかしながら、抗体が多重特異性である必要はないことに留意)において例示されている。付加的な抗体には、ヒト成長ホルモン(hGH)、N-メチオニルヒト成長ホルモン、ウシ成長ホルモン、副甲状腺ホルモン、チロキシン、インスリンA鎖、インスリンB鎖、プロインスリン、リラクシンA鎖、リラクシンB鎖、プロリラクシン、卵胞刺激ホルモン(FSH)のような糖タンパク質ホルモン、副甲状腺刺激ホルモン(TSH)、及び黄体形成ホルモン(LH)、糖タンパク質ホルモンレセプター、カルシトニン、グルカゴン、第VII因子、肺サーファクタント、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、ヒト組織型プラスミノゲン活性剤(t-PA)、ボンベシン、第IX因子、トロンビン、造血成長因子、腫瘍壊死因子-アルファ及びベータ、エンケファリナーゼ、ヒト血清アルブミン、ミューラー阻害物質、マウスゴナドトロピン関連ペプチド、細菌蛋白、例えばベータ-ラクタマーゼ、組織因子タンパク質、インヒビン、アクチビン、血管内皮成長因子(VEGF)、ホルモン又は成長因子のレセプター、インテグリン、トロンボポイエチン、プロテインA又はD

、リウマチ因子、神経成長因子、例えばNGF- β 、血小板成長因子、形質転換成長因子(TGF)、例えばTGF- α 及びTGF- β 、インスリン様成長因子-I及び-II、インスリン様成長因子結合タンパク質、CD-4、RNアーゼ、潜伏関連ペプチド(latency associated peptide)、エリスロプロテイン、オステオインダクティブ因子、インターフェロン α 、 β 、 γ のようなインターフェロン、コロニー刺激因子(CSF)、例えばM-CSF、GM-CSF及びG-CSF、インターロイキン(IL)、例えばIL-1、IL-2、IL-3、IL-4、スーパーオキシドジスムターゼ、崩壊促進因子、ウイルス性抗原、HIVエンベロープタンパク質、例えばG

P120、GP140、心房性ナトリウム利尿ペプチドA、B又はC、免疫グロブリン、及び前掲のタンパク質の任意のフラグメントが含まれる。

好ましくは、第1の遺伝子は約100を越えるアミノ酸残基を有する一又は複数のサブユニットのポリペプチドをコードし、標的と相互作用可能な複数のアミノ酸を示す複数の強固な2次構造を形成するように折り畳まれる。好ましくは、第1の遺伝子は、強固な2次構造の完全性が保持されるように、標的と相互作用可能なアミノ酸のみに相当するコドンで変異させる。

通常、本発明の方法は、M13KO7、M13R408、M13-VCS、及びPhiX174から選択されるヘルパーファージを使用する。好ましいヘルパーファージはM13KO7であり、好ましいコートタンパク質はM13ファージ遺伝子IIコートタンパク質である。好ましい宿主は大腸菌、及び大腸菌のプロテアーゼ欠乏株である。本発明の方法で選択される新規なhHG変異体が検出された。ファージコートタンパク質とポリペプチドをコードする核酸の間に機能的に位置する抑圧終止コドンを含むファージミド発現ベクターが作成された。

1. ファージの表面に示されるポリペプチドの選択

「ポリペプチド」選択サイクルの繰り返しを用いて、複数の選択サイクルを行うことで選択される多様なアミノ酸変化のファージミド選択により、更により高い親和結合性を有するものを選択する。リガンド又は抗体ポリペプチドにおけるアミノ酸選択の第1の領域を含むファージミド選択の第1ラウンドに続いて、リ

ガンドのアミノ酸又は他の領域におけるファージミド選択の付加的ラウンドが行われる。ファージミド選択のサイクルは所望の親和性が達成されるまで繰り返される。この方法を例示するために、実施例4のファージディスプレイはサイクルで実施した。プールされたアフィニティ、異なったCDRからの変異の組合わせ等々。

上記から、ポリペプチドの結合ドメインを形成するアミノ酸残基は連続的に結合せず、ポリペプチドの異なるサブユニット上に存在しうることが理解される。つまり、結合ドメインは1次構造ではなく、結合部位の特定の2次構造で追跡するからである。よって、一般的に、変異は、標的と相互作用する可能性を有するように、ポリペプチドの内部から離れた部位に、特定の2次構造内のアミノ酸を

コードするコドンに導入される。

しかしながら、標的分子に対する抗体又はリガンドとして選択されるポリペプチドが該標的に正常に結合することは必要ではない。よって、例えば、糖タンパク質、例えばTSHを、FSHレセプターのリガンドとして選択することができ、変異TSH分子のライブラリが、新薬候補を生産する本発明の方法において使用される。

よって、この発明は、標的分子、特に抗体に結合する任意のポリペプチドを対象とする。好ましいポリペプチドは医薬上有用なものである。抗体の例はセクションII.A. 抗体の調製、(v i) 多重特異性抗体(しかしながら、抗体が多重特異性である必要はないことに留意)において例示されている。好ましいポリペプチドには、ヒト成長ホルモン、デス-N-メチオニルヒト成長ホルモン、及びウシ成長ホルモン；甲状腺刺激ホルモン；チロキシン；インスリンA鎖、インスリンB鎖；プロリラクシン；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；細菌タンパク質、例えばベータラクタマーゼ；組織因子タンパク質；インヒビン；アクチビン；血管内皮成長因子；ホルモン又は成長因子のレセプター；インテグリン；トロンボポイエチン；プロテインA又はD；リウマチ因子；神経成長因子、例えばNGF- β ；血小板誘導成長因子；繊維芽細胞成長因子、例えばaFGF及びbFGF；上皮成長因子；形質転換成長因子(TGF)、例えばTGF- α 及びTGF- β ；

インスリン様成長因子-I 及び-I I ; インスリン様成長因子結合タンパク質 ; C D-4 ; R Nアーゼ ; 潜伏関連ペプチド ; エリスロプロテイン ; オステオインダクティブ因子 ; 例えばH I Vエンベロープの一部 ; 免疫グロブリン ; 及び前掲のタンパク質の任意のフラグメントが含まれる。加えて、ポリペプチドの予め決められていた一又は複数のアミノ酸残基を置換、挿入又は欠失させて、例えば改良された生物学的特性を有する生成物を生成することもできる。さらに、これらポリペプチドのフラグメント、特に生物学的に活性なフラグメントも含まれる。この発明のさらに好ましいポリペプチドはヒト成長ホルモン、及び心房性ナトリウム利尿ペプチドA、B又はC、エンドトキシン、サブチリシン、トリプシン及び他のセリンプロテアーゼである。

またポリペプチドとして好ましいものは、同じ細胞型上のレセプターに特異的

に結合する第1の細胞に生産されるアミノ酸配列として定義でき、レセプター担持細胞の生理的応答特性を引き起こしたホルモン(自己分泌ホルモン)である。そのようなポリペプチドホルモンとしては、サイトカイン、リンホカイン、神経栄養ホルモン及び下垂体前葉ポリペプチド、例えば成長ホルモン、プロラクチン、胎盤ラクトゲン、黄体形成ホルモン、卵胞刺激ホルモン、 β -リポトロピン、 γ -リポトロピン及びエンドルフィン ; 視床下部放出阻害ホルモン、例えば副腎皮質刺激ホルモン放出因子、成長ホルモン放出阻害ホルモン、成長ホルモン放出因子 ; 及び他のポリペプチドホルモン、例えば心房性ナトリウム利尿ペプチドA、B又はCである。

2. 所望のポリペプチドをコード化した第1の遺伝子(遺伝子1)の獲得

所望のポリペプチド(例えば抗体)をコード化した遺伝子は、当該分野で公知の方法で得ることができる(一般的に、Sambrookら、*Molecular Biology: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York, (1989)を参照)。遺伝子の配列が既知であるならば、遺伝子をコード化したDNAは化学的に合成することができる(Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **85**:2149 (1963))。遺伝子の配列が未知か、過去に遺伝子が単離されていない場合は、cDNAライブラリ(所望のDNAが発現した適切な組織から得られたDNAから作製)から又は適切なゲノムDNAライブラ

りからクローニングすることができる。ついで、適当なプローブを使用して遺伝子を単離する。cDNAライブラリに対して、適切なプローブには、モノクローナル又はポリクローナル抗体(cDNAライブラリが発現ライブラリである場合)、オリゴヌクレオチド、及び相補的又は相同的cDNA又はそれらのフラグメントが含まれる。ゲノムDNAライブラリから関心ある遺伝子を単離するために使用されるプローブには、同一又は類似した遺伝子をコード化したcDNA又はそれらのフラグメント、相同的なゲノムDNA又はDNAフラグメント及びオリゴヌクレオチドが含まれる。選択されたプローブを用いてのcDNA又はゲノムライブラリのスクリーニングは、前掲のSambrookらの10-12章に記載されている標準的な手順を使用して行われる。

また関心あるポリペプチド(例えば抗体)をコード化した遺伝子を単離する代替手段は、前掲のSambrookらのセクション14に記載されているようなポリメラー

ゼ鎖反応法(PCR)の使用である。この方法には、関心ある遺伝子がハイブリダイズするオリゴヌクレオチドの使用が必要で、よって、この遺伝子のDNA配列の少なくともいくつかはオリゴヌクレオチドの生成のために既知でなければならない。

遺伝子が単離された後、前掲のSambrookらにおいて一般的に記載されているようにして、それを適切なベクターに挿入し、増幅させる。

3. 複製可能な発現ベクターの作成

種々のタイプのベクターが入手可能であり、本発明の実施に使用することができるが、比較的容易に作成できるので、プラスミドベクターがここで使用するために好ましいベクターであり、容易に増幅することができる。一般的にプラスミドベクターは、プロモータ、シグナル配列、表現型選択遺伝子、複製開始部位、及び当業者に既知の他の必要な成分を含む種々のコンポーネントを含む。

原核生物ベクターに最も一般的に使用されるプロモータには、l a c Zプロモータ系、アルカリ性ホスファターゼp h o Aプロモータ、バクテリオファージλ P Lプロモータ(温度感受性プロモータ)、t a cプロモータ(l a cレプレッサにより制御されるハイブリッドt r p-l a cプロモータ)、トリプトファンプロ

モータ、及びバクテリオファージT7プロモータが含まれる。プロモータの一般的記載については、前掲のSambrookらセクション17を参照されたい。これらは最も一般的に使用されるプロモータであるが、他の適切な微生物プロモータをさらに使用してもよい。

本発明の実施において好ましいプロモータは、融合遺伝子の発現が制御可能なように厳しく調節できるものである。発現が制御されないとファージミドの表面に融合タンパク質の複数の複製が生じ、標的とファージミドとの多点での接合が生じる。「結合活性」又は「キレート効果」とも称されるこの多点接合により、標的を「キレート化」するように相互に極めて近接してファージミド粒子上に示される融合タンパク質の複数の複製により、偽の「高親和性」ポリペプチドが選択される結果になると考えられる。多点接合が生じると、有効な又は見かけのK_dは示された融合タンパク質の各複製の個々のK_dの積と同じくらい高くなる。

融合タンパク質の複数の複製を含有するファージミド粒子が、少量、すなわちの約1%未満であるように融合タンパク質の発現を厳しく制御することにより、「キレート効果」が解消されて、高親和性ポリペプチドの適切な選択が可能になる。よって、プロモータに応じて、宿主の培養条件は、融合タンパク質の単一の複製を含むファージミド粒子の数を最大とし、融合タンパク質の複製を複数含有するファージミド粒子の数が最小となるように調整される。

この発明の実施において使用される好ましいプロモータは、lacZプロモータ及びphoAプロモータである。lacZプロモータはlacレプレッサタンパク質lacIにより制御され、よって融合遺伝子の転写はlacレプレッサタンパク質のレベルの操作により制御される。例示すると、lacZプロモータを含むファージミドを、lacIレプレッサ遺伝子、lacZプロモータのレプレッサの複製を含む細胞株で増殖させる。lacI遺伝子を含有する細胞株の例には、JM101及びXL-1ブルーが含まれる。また、宿主細胞はレプレッサlacI及びlacZプロモータの両方を含有するプラスミドと同時形質移入することができる。しばしば、上述の方法の両方が同時に使用され、この場合、lacZプロモータを含有するファージミド粒子を、lacI遺伝子を含有する細胞

株中で増殖させ、細胞株を lacZ と lac 遺伝子の両方を含有するプラスミドと同時形質移入する。通常、遺伝子の発現を望む場合は、上述の形質移入した宿主に、誘発物質、例えばイソプロピルチオガラクトシド (IPTG) を添加する。しかしながら、本発明において、この工程は、(a) ファージミドの数当りの遺伝子 III 融合体の発現を最小にし、(b) 低濃度においてさえ IPTG 等の誘発物質に起因するファージミドの不十分又は不適切なパッケージングを防止するために、省かれる。典型的には、誘発物質が添加されない場合は、ファージミド粒子当りの融合タンパク質の数は 0.1 を越える (ファージミド粒子のバルク融合タンパク質の数)。この発明を実施するために使用される最も好ましいプロモータは phoA である。このプロモータは、ホスファートがプロモータの活性をダウンレギュレーションするように作用する細胞における無機ホスファートのレベルにより制御されると考えられている。従って、ホスファートから細胞を枯渇させることにより、プロモータの活性を増加させることができる。所望の結果は、2YT 又は LB 等のホスファートリッチの培地で細胞を増殖させて遺伝子 III 融合体

の発現をコントロールすることにより、達成される。

この発明を実施するために使用されるベクターの他の有用な成分は、シグナル配列である。この配列は典型的には融合タンパク質をコード化する遺伝子の 5' に隣接して位置し、よって融合タンパク質のアミノ末端で転写される。しかし、ある場合では、シグナル配列は、分泌されるタンパク質をコード化している遺伝子に対して 5' 以外の位置に位置していることが示された。この配列は、細菌細胞の内膜に交差して接合するタンパク質を標的としている。シグナル配列をコード化した DNA は、シグナル配列を有するタンパク質をコード化した任意の遺伝子から、制限エンドヌクレアーゼフラグメントとして得られる。適切な原核生物のシグナル配列は、例えば LamB 又は OmpF (Wong ら, Gene 68:193 (1983))、MalE、PhoA をコードしている遺伝子及び他の遺伝子から得ることができる。この発明の実施に対して好ましい原核生物のシグナル配列は、Chang ら, Gene 55:189 (1987) に記載された大腸菌熱安定性エンテロトキシン III (STIII) シ

グナル配列である。

この発明を実施するために使用されるベクターの他の有用な成分は、表現型選択遺伝子である。典型的な表現型選択遺伝子は、宿主細胞に抗生物質耐性を付与するタンパク質をコード化したものである。例示すると、アンピシリン耐性遺伝子(amp)、及びテトラサイクリン耐性(tet)が、この目的のために直ぐに使用される。

上述の成分並びに記載されたポリペプチドをコード化した遺伝子(遺伝子1)を含有する適切なベクターの作成物は、前掲のSambrookらにより記載されている標準的な組換えDNA法を使用して調製される。ベクターの形成のために組合せられる単離したDNAフラグメントを切断し、仕立て、所望のベクターが生成されるような特定の順序及び配向で互いにライゲーションさせる。

DNAは、適切なバッファーに入った適切な制限酵素又は酵素を使用して切断される。一般的に、約0.2-1 μ gのプラスミド又はDNAフラグメントが、約20 μ lのバッファー溶液に入った1-2単位の適切な制限酵素と共に使用される。適切なバッファー、DNA濃度、及びインキュベーション時間及び温度は、制限酵素の製造者により特定される。一般的に、37℃で1又は2時間のインキュ

ベーション時間が適当であるが、いくつかの酵素ではより高い温度が必要になる。インキュベーション後、酵素及び他の汚染物質を、フェノールとクロロホルムの混合物で消化溶液を抽出することにより除去し、DNAを、エタノールでの沈殿により水性画分から回収する。

DNAフラグメントを共にライゲーションして機能的ベクターを形成するためには、DNAフラグメントの末端は互いに適合性がなければならない。ある場合においては、末端はエンドヌクレアーゼ消化後に直ちに適合性を有する。しかし、先ず、エンドヌクレアーゼ消化により通常生成される粘着末端を平滑末端に転化させて、ライゲーションに対して適合させることが必要である。末端を平滑にするために、DNAを、4つのデオキシヌクレオチドリホスファートの存在下で、10単位のDNAポリメラーゼI(クレノウ)のクレノウフラグメントを用い、15℃で少なくとも15分間、適切なバッファー中で処理する。ついで、DN

Aを、フェノール-クロロホルム抽出及びエタノール沈殿により精製する。

切断されたDNAフラグメントは、DNAゲル電気泳動法を使用し、大きさにより分離され、選択される。DNAはアガロース又はポリアクリルアミドマトリックスのいずれかを通して電気泳動にかけられる。マトリックスの選択は分離されるDNAフラグメントの大きさに依存する。電気泳動後、DNAは電気溶解によりマトリックスから抽出されるか、低溶融性アガロースがマトリックスとして使用される場合は、前掲のSambrookらのセクション6.30-6.33に記載されているように、アガロースを溶解させ、そこからDNAが抽出される。

一緒にライゲーションされるDNAフラグメント(ライゲーションさせる各フラグメントの末端が適合するように、適切な制限酵素で予め消化されている)を、ほぼ等モル量の溶液に入れる。溶液は、DNA 0.5 μ g 当たり約10単位のT4 DNAリガーゼ等のリガーゼ、リガーゼバッファー及びATPをまた含有する。DNAフラグメントがベクター中でライゲーションされる場合は、ベクターは、まず適切な制限エンドヌクレアーゼで切断して、線形にする。ついで、線形化されたベクターをアルカリ性ホスファターゼ又は子ウシの腸ホスファターゼで処理する。ホスファターゼ化により、ライゲーション工程中のベクターのセルフライゲーションが防止される。

ライゲーション後、今挿入された外来性遺伝子でベクターを、適切な宿主細胞中に形質転換させる。原核生物はこの発明において好ましい宿主細胞である。適切な原核宿主細胞には、大腸菌株M101、大腸菌K12株294 (ATCC番号31, 446)、大腸菌株W3110 (ATCC番号27, 325)、大腸菌X1776 (ATCC番号31, 537)、大腸菌XL-1ブルー(ストラタジーン)、及び大腸菌Bが含まれるが；大腸菌の他の菌株、例えばHB101、NM522、NM538、NM539及び原核生物の多くの他の種及び遺伝子をさらに使用することができる。前掲の大腸菌株の列挙に加えて、バシリ、例えば枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、他の腸内細菌、例えばマウスチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) 又はセラチアマルセサンズ (*Serratia marcescens*)、及び種々のシュードモナス (*Pseudomonas*) 種が、宿主として使用される。

原核細胞の形質転換は、前掲のSambrookらのセクション1. 82に記載されている塩化カルシウム法を使用して、容易に達成される。あるいは、電気穿孔法 (Neumannら, EMBO J. 1:841 (1982)) をこれらの細胞の形質転換に使用することもできる。形質転換した細胞は、抗生物質、通常はテトラサイクリン (t e t) 又はアンピシリン上での増殖により選択され、ベクター上に t e t 及び／又は a m p 耐性遺伝子が存在することによりそれらに耐性が付与される。

形質転換した細胞の選択後、これらの細胞を培養して成長させ、ついでプラスミドDNA (又は外来性遺伝子が挿入された他のベクター) を単離する。プラスミドDNAは、当該分野において知られている方法を使用して単離することができる。前掲のSambrookらのセクション1. 25-1. 33に記載されているような、小規模のDNA調製及び大規模なDNA調製の2つの適切な方法がある。単離されたDNAは、Sambrookらのセクション1. 40に記載されているような、当該分野において既知の方法により精製される。ついでこの精製プラスミドは制限酵素マッピング及び／又はDNA配列決定により分析される。DNA配列決定は、一般的に、Messingら, Nucleic Acid Res. 9:309 (1981) の方法又はMaxamら, Meth. Enzymol. 65:499 (1980) の方法のいずれかにより行われる。

4. 遺伝子融合

本発明のファージ親和性工程は、転写中に融合遺伝子が生成されるように、所望のポリペプチドを包含する遺伝子 (遺伝子1) を第2の遺伝子 (遺伝子2) に融合させることを意図している。遺伝子2は、典型的にはファージのコートタンパク質遺伝子であり、好ましくはファージM13遺伝子IIIコートタンパク質又はそれらのフラグメントである。遺伝子1と2の融合は、遺伝子1を含有するプラスミドの特定の部位に遺伝子2を挿入するか、又は遺伝子2を含有するプラスミドの特定の部位に遺伝子1を挿入することにより達成される。

プラスミドに遺伝子を挿入するには、プラスミドを遺伝子が挿入される正確な位置で切断する必要がある。よって、この位置は制限エンドヌクレアーゼ部位でなくてはならない (好ましくは、プラスミドが制限エンドヌクレアーゼ消化の間に一カ所で切断されるのみであるような独特の部位)。プラスミドは、上述のよ

うに消化され、ホスファターゼ化され、そして精製される。ついで遺伝子が、2つのDNAを共にライゲーションすることにより、この線形化プラスミドに挿入される。プラスミドの末端が挿入される遺伝子の末端と適合するならば、ライゲーションは完了する。同じ制限酵素がプラスミドの切断と挿入される遺伝子の単離の双方に使用されるならば、前掲のSambrookらのセクション1.68に記載されているように、DNAはリガーゼ、例えばバクテリオファージT4 DNAリガーゼを使用し、ATP及びリガーゼバッファーの存在下で1-4時間、16℃で、混合物をインキュベートすることにより、直接ライゲーションさせることができる。末端が適合しないものであれば、バクテリオファージT4 DNAポリメラーゼ又はDNAポリメラーゼIクレノウフラグメントを用い、末端を平滑にしなければならず、両者共、消化されるDNAの突出した1本鎖末端に充填するために4つのデオキシリボヌクレオチドトリホスファートが必要である。あるいは、末端はヌクレアーゼS1又は緑豆ヌクレアーゼ等のヌクレアーゼを使用して平滑にしてもよく、両者の機能はDNAの突出した1本鎖を切断することである。ついで、DNAは前掲のリガーゼを使用して再ライゲーションされる。いくつかの場合においては、コード領域のリーディングフレームが変性しているため、挿入される遺伝子の末端を平滑にすることができない。この問題を克服するため、オリゴヌクレオチドリンカーを使用することができる。このリンカーは、挿入される遺伝子にプラスミドをつなぐ橋となる。これらのリンカーは、標準的な方法を使用し、

2本鎖又は1本鎖DNAとして合成することができる。リンカーは挿入される遺伝子の末端と適合する一端を有している；リンカーはまず上述のライゲーション法を使用して遺伝子にライゲーションされる。リンカーの他端は、ライゲーションのためにプラスミドと適合するように設計される。リンカーの設計においては、挿入される遺伝子のリーディングフレーム又はプラスミドに含まれる遺伝子のリーディングフレームを破壊しないように留意することが必要である。いくつかの場合においては、リンカーがアミノ酸の一部をコードするか、一又は複数のアミノ酸をコード化するように、リンカーを設計する必要がある。

遺伝子1と遺伝子2の間に、終止コドンをコード化したDNAを挿入してよく、そのような終止コドンはUAG (アンバー)、UAA (オーカー) 及びUGA (オペル) である (Microbiology, Davisら, Harper & Row, New York, 1980, pp237, 245-47 及び274)。野生型宿主細胞に発現する終止コドンにより、遺伝子2タンパク質に合することなく、遺伝子1タンパク質産物の合成がなされる。しかしながら、サプレッサ宿主細胞の成長により、検出可能な量の融合タンパク質が合成される。このようなサプレッサ宿主細胞は、mRNAの終止コドンの位置にアミノ酸を挿入するように修飾されたtRNAを含有し、よって検出可能な量の融合タンパク質が生成される。このようなサプレッサ宿主細胞は、よく知られており、例えば、大腸菌サプレッサ株が記載されている (Bullockら, BioTechnologies 5, 376-379 (1987))。任意の許容可能な方法を、融合ポリペプチドをコード化したmRNAに、終止コドンを配するのに使用することができる。

抑制コドンは、ポリペプチドをコード化した第1の遺伝子とファージコートタンパク質の少なくとも一部をコード化した第2の遺伝子の間に挿入され得る。あるいは、抑制終止コドンは、ファージコートタンパク質の第1アミノ酸又はポリペプチドの最後のアミノ酸三つ組を置換することにより、融合部位に隣接して挿入され得る。抑制コドンを含むファージミドがサプレッサ宿主細胞で増殖される場合、コートタンパク質及びポリペプチドを含む融合ポリペプチドが転出可能な程に生成される。ファージミドが非サプレッサ宿主細胞で成長する場合、実質的に、UAG、UAA又はUGAをコードしている挿入された抑制三つ組で終止するため、ファージコートタンパク質に融合することなくポリペプチドが合

成される。非サプレッサ細胞において、ポリペプチドは合成され、宿主細胞にそれを固定等する融合ファージコートタンパク質が存在しないため、宿主細胞から分泌される。

5. 選択された位置における遺伝子1の変更 (変異)

所望のポリペプチドをコード化した遺伝子1は、一又は複数の選択されたコドンで変更されてもよい。しかし、異性化可能なアスパルチル残基に相当するコドン

ンは変えなければならない。変更とは、ポリペプチドをコード化した遺伝子における一又は複数のコドンの置換、欠失又は挿入であり、同じポリペプチドの未変更又は未変性配列に比べ、結果としてポリペプチドのアミノ酸配列が変化することと定義される。好ましくは、変更は、分子の一又は複数の領域において、任意の他のアミノ酸で、少なくとも1つのアミノ酸を置換することによりなされる。変更は当該技術で公知の種々の方法でなされ得る。限定するものではないが、これらの方法にはオリゴヌクレオチド媒介性変異誘発及びカセット変異誘発が含まれる。

a. オリゴヌクレオチド媒介性変異誘発

オリゴヌクレオチド媒介性変異誘発は遺伝子1の置換、欠失及び挿入変異体を調製するのに好ましい方法である。この技術は、Zollerら, *Nucleic Acids Res.* **10:6487-6504 (1987)**に記載されているように、当該分野においてよく知られている。簡単には、遺伝子1は所望の変異をコード化したオリゴヌクレオチドをDNAテンプレートにハイブリダイズすることにより変更され、ここでテンプレートは遺伝子1の未変性又は天然のDNA配列を含有するプラスミドの1本鎖形態をしている。ハイブリダイゼーション後、DNAポリメラーゼを使用して、テンプレートの第2相補的ストランド全体を合成し、これがオリゴヌクレオチドプライマーに挿入されて遺伝子1の選択された変更をコードする。

一般的に、少なくとも25ヌクレオチド長さのオリゴヌクレオチドが使用される。最適なオリゴヌクレオチドは、変異をコードするヌクレオチドの両側のテンプレートに完全に相補的な12~15のヌクレオチドを有する。これにより、オリゴヌクレオチドは1本鎖DNAテンプレート分子に、正しく確実にハイブリダイズされる。オリゴヌクレオチドは、Creaら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

75:5765 (1978)により記載されたように、当該分野において公知の技術を使用して、容易に合成される。

DNAテンプレートは、Vieraら, *Meth. Enzymol.* **153:3 (1987)**に記載された1本鎖ファージの原型又は複製を含有するベクター、又はバクテリオファージM13ベクター (一般的に入手可能なM13mp18及びM13mp19ベクターが適

切である)から誘導されるベクターによってのみ作製される。よって、変異されることになるDNAは、1本鎖テンプレートを作製するために、これらのベクターに挿入されなくてはならない。1本鎖テンプレートの作製法は、前掲のSambrookらのセクション4. 21-4. 41に記載されている。

未変性DNA配列を変更するために、オリゴヌクレオチドが適切なハイブリダイゼーション条件下で1本鎖テンプレートにハイブリダイズされる。ついで、DNA重合化酵素、通常DNAポリメラーゼIのクレノウフラグメントを添加し、合成のプライマーとしてオリゴヌクレオチドを使用するテンプレートの相補的ストランドを合成する。よって、ヘテロ2本鎖分子が形成されて、DNAの一方のストランドが遺伝子1の変異型をコードし、他方のストランド(原型のテンプレート)が遺伝子1の天然で未変更の配列をコードする。ついで、このヘテロ2本鎖分子が適切な宿主細胞、通常は原核生物、例えば大腸菌JM-101において形質転換される。細胞の増殖後、それらをアガロースプレート上に蒔き、³²ホスファートで放射能標識されたオリゴヌクレオチドプライマーを使用してスクリーニングし、変異DNAを含む細菌コロニーを同定する。

直ぐ上に記載した方法は、ホモ2本鎖分子が、プラスミドの両方のストランドが変異を含むように作製されるように、変更してもよい。変更点は以下の通りである：1本鎖オリゴヌクレオチドを上述の1本鎖テンプレートにアニールする。3つのデオキシリボヌクレオチド、デオキシリボアデノシン(dATP)、デオキシリボグアノシン(dGTP)、及びデオキシリボチミジン(dTTP)の混合物を、dCTP-(aS)と呼ばれる変性チオ-デオキシリボシトシン(アマシャム)と組合せる。この混合物をテンプレート-オリゴヌクレオチド複合体に添加する。この混合物にDNAポリメラーゼを添加し、変異した塩基を除いてテンプレートと同一のDNAのストランドを作製する。加えて、この新しいDNAのストランドはd

CTPの代わりにdCTP-(aS)を含有しており、これがそれを制限エンドヌクレアーゼ消化から保護する。2本鎖のヘテロ二重鎖のテンプレートストランドを適切な制限酵素でニッキングした後、テンプレートストランドは、変異した部

位を含有する領域を越えたところで、Exoヌクレアーゼ又は他の適切なヌクレアーゼで消化することができる。ついでこの反応を終了させ、部分的にのみ1本鎖である分子に残す。ついで、2本鎖DNAホモ二重鎖を、4つのデオキシリボヌクレオチドトリホスファート、ATP及びDNAリガーゼの全てが存在するDNAポリメラーゼを使用して形成させる。ついで、このホモ二重鎖分子は、適切な宿主細胞、例えば上述の大腸菌JM-101において形質転換される。

一又は複数のアミノ酸が置換される変異は、いくつかの態様の一つで生じ得る。ポリペプチド鎖においてアミノ酸が互いに近接して位置しているならば、所望のアミノ酸置換の全てをコードする一つのヌクレオチドを使用して同時に変異させてもよい。しかし、アミノ酸が互いにある距離をおいて位置しているならば(約10を越えるアミノ酸により分離している)、所望する変化の全てをコード化した単一のヌクレオチドを作製することはより困難である。代わりに、一又は二の代替方法を使用することができる。

第1の方法では、別個のヌクレオチドを置換される各アミノ酸に対して作製する。ついでオリゴヌクレオチドを、同時に1本鎖らせん構造テンプレートDNAにアニールし、テンプレートから合成されるDNAの第2のストランドが所望のアミノ酸置換の全てをコードする。他の代わりの方法では、所望の変異体を生成するため2又はそれ以上の変異誘発のラウンドが含まれる。第1ラウンドは単一の変異体に対して記載したものと同様である；野生型DNAがテンプレート用を使用され、最初の所望のアミノ酸置換をコード化したオリゴヌクレオチドをこのテンプレートにアニールし、ヘテロ二重鎖DNA分子をついで生成させる。変異誘発の第2ラウンドは、変異誘発の第1ラウンドで生成された変異DNAをテンプレートとして利用する。よって、このテンプレートは、既に一又は複数の変異を含んでいる。ついで、更なる所望のアミノ酸置換をコード化したオリゴヌクレオチドをこのテンプレートにアニールし、結果として得られるDNAストランドは、変異誘発の第1及び第2ラウンドの両方からの変異を新たにコードする。こ

の結果得られたDNAは、変異誘発の第3ラウンドのテンプレート等として使用することができる。

b. カセット変異誘発

この方法も、遺伝子1の置換、欠失及び挿入変異体を調製するのに好ましい方法である。この方法は、Wellら, *Gene* 34:315 (1985)に記載されたものに基づいている。出発物質は、変異される遺伝子である遺伝子1を含有するプラスミド(又は他のベクター)である。変異される遺伝子1のコドン(類)を同定する。同定された変異部位(類)の各側に独特の制限エンドヌクレアーゼ部位がなくてはならない。そのような制限部位が存在しないならば、それらを、上述のオリゴヌクレオチド媒介性変異誘発法を使用し、遺伝子1の適切な位置にそれらを導入して、作製することができる。制限部位をプラスミドに導入した後、プラスミドをこれらの部位で切断して、線形にする。所望の変異(類)を含有するが、制限部位の間のDNA配列をコード化した2本鎖オリゴヌクレオチドを、標準的な手順を使用して合成する。2つのストランドを別個に合成し、ついで標準的な技術を使用して一緒にハイブリダイズする。この2本鎖オリゴヌクレオチドはカセットと称される。このカセットは線形化プラスミドの末端と適合する3'及び5'末端を有するように設計されており、プラスミドに直接ライゲーションすることができる。このプラスミドは、今、遺伝子1の変異体DNA配列を含む。

6. 所望のタンパク質をコード化したDNAの獲得

他の実施態様において、この発明は一又は複数のサブユニットを含む所望のタンパク質の変異体の生産を対象としている。各サブユニットは典型的には別の遺伝子によりコードされる。各サブユニットをコード化する遺伝子は、当該分野において公知の方法(例えば、セクションIIを参照)で得ることができる。いくつかの例においては、セクションIIに記載された任意の方法から選択される別個の技術を使用し、種々のサブユニットをコード化した遺伝子を得ることが必要になる。

関心あるタンパク質が1を越えるサブユニットを含有する複製可能な発現ベクターを作成する場合、全てのサブユニットは、典型的にはサブユニットをコード化したDNAの5'に位置する同一のプロモータにより調節可能であるか、各プロ

モータが調節を意図したDNAに作用可能に結合するように、ベクターにおいて適切に配向した別のプロモータによりそれぞれ制御され得る。プロモータの選択は前掲のセクション I I I に記載されているようにして行われる。

複数のサブユニットを有する関心あるタンパク質をコード化したDNAを含有する複製可能な発現ベクターを作成する際には、読者は、例として抗体フラグメントの各サブユニットをコード化したDNAを示すベクターが図示されている図 I I を参照されたい。この図には、一般的には、関心あるタンパク質の1つのサブユニットが、ファージコートタンパク質、例えばM13遺伝子 I I I に融合されていることが示されている。この遺伝子融合は、一般的にそれ自身のシグナル配列を含んでいる。別の遺伝子は他のサブユニット又はサブユニット類をコードしており、各サブユニットが一般にそれ自身のシグナル配列を有していることは明らかである。また、図 1 1 は単一のプロモータが両方のサブユニットの発現を調節可能であることを示している。あるいは、各サブユニットは異なるプロモータにより、独立して制御されうる。関心あるタンパク質のサブユニット-ファージコートタンパク質融合の作成は、上述のセクション I V に記載したようにして作製することができる。

所望のマルチ-サブユニットタンパク質の変異体ファミリーを作成する場合、ベクターにおける各サブユニットをコード化したDNAは、各サブユニットにおける一又は複数の位置で変異し得る。マルチ-サブユニット抗体の変異体を作成する場合、変異誘発の好ましい部位は、軽鎖、重鎖の何れか、又は両方の鎖の相補性決定領域(CDR)に位置するアミノ酸残基をコード化したコドンに対応する。CDRは、通常、高頻度可変領域と称される。関心あるタンパク質の各サブユニットをコード化したDNAを変異誘発させる方法は、本質的に、上述のセクション V に記載されているようにして実施される。

7. 標的分子の調製及びプラスミドとの結合

標的分子、例えばレセプターは、天然源から単離されるか、当該分野において公知の手順による組換え法により調製される。例示すると、糖タンパク質ホルモンレセプターが、McFarlandら、*Science* 245:494-499 (1989) に記載されている技術により調製され、大腸菌で発現する非グリコシル化形態が、Fuhら、*J. Biol.*

Chem 265:3111-3115 (1990) により記載されている。他のレセプターは標準的な方法で調製することができる。

精製標的分子を適切なマトリックス、例えばアガロースビーズ、アクリルアミド、ガラスビーズ、セルロース、種々のアクリル酸コポリマー、ヒドロキシアルキルメタクリレートゲル、ポリアクリル酸又はポリメタクリル酸コポリマー、ナイロン、中性及びイオン性のキャリア等に付着させる。標的タンパク質のマトリックスへの付着は、Methods in Enzymol. 44 (1976) に記載されている方法、又は当該分野において公知の他の手段により達成される。

標的タンパク質をマトリックスへ付着させた後、固定化された標的を、固定化された標的とファージミド粒子の少なくとも一部が結合するための適切な条件下で、ファージミド粒子のライブラリと接触させる。通常、pH、イオン強度、温度等を含む条件は、模倣生理的条件である。

固定化された標的に対し高親和性を有する結合ファージミド粒子(「バインダー」)を、洗浄により、低親和性を有するもの(よって、標的に結合していない)から分離する。バインダーを、種々の方法で固定化された標的から解離させる。これらの方法には、種々の方法による固定化された標的からの競合解離が含まれる。これらの方法には、野生型リガンドを使用し、pH及び/又はイオン強度を変更する競合解離、及び当該分野において公知の方法が含まれる。

適切な宿主細胞を、バインダー及びヘルパーファージに感染させ、宿主細胞をファージミド粒子の増幅に適切な条件下で培養する。ついでファージミド粒子を収集し、標的分子に対する所望の親和性を有するバインダーが選択されるまで、選択工程を一又は複数回繰り返す。

場合によっては、特定の標的に対する選択性を改良するため、ファージミド粒子のライブラリを、一又は複数の固定化された標的に連続して接触させる。例えば、リガンド、例えばhGHが1を越える天然レセプターを有する場合においてしかりである。hGHの場合、成長ホルモンレセプター及びプロラクチンレセプターの両方とも、hGHリガンドに結合する。プロラクチンレセプター以上に成長ホルモンレセプターに対する選択性を改良することが望ましい。このことは、まず、固定化されたプロラクチンレセプターとファージミド粒子のライブラリを

接触させ、プロラクチンレセプターに対し低親和性を有するもの(すなわち、野生型hGHよりも低い)を溶出させ、ついで、固定化された成長ホルモンレセプターと低親和性プロラクチン「バインダー」又は非バインダーを接触させ、高親和性の成長ホルモンレセプターバインダーを選択することにより達成され得る。この場合において、成長ホルモンレセプターに対する親和性が野生型hGHのものよりも幾分低くても、プロラクチンレセプターに対し、より低い親和性を有するhGH変異体は治療に有用である。この同じ方法が、クリアランスレセプター以上に、その一次機能レセプターに対する特定のホルモン又はタンパク質の選択性を改良するために使用することができる。

この発明の他の実施態様において、改良基質アミノ酸配列を得ることができる。これらはタンパク質リンカーのためのより良好な「切断部位」、又は良好なプロテアーゼ基質/インヒビターの作製に有用である。この実施態様において、固定化可能な分子(例えばhGH)のレセプター、ビオチン-アビジン、又はマトリックスと共有結合が可能なものは、リンカーにより遺伝子IIIに融合される。リンカーは、好ましくは3~10のアミノ酸長さのもので、プロテアーゼの基質として作用する。ファージミドは上述のようにして作成され、ここでリンカー領域をコード化したDNAはランダムに変異されて、結合部位に異なるアミノ酸配列を有するファージミド粒子のランダムライブラリが作製される。ついで、ファージミド粒子のライブラリがマトリックスに固定され、所望のプロテアーゼに暴露される。所望のプロテアーゼに対する線形領域において好ましいか又はより良好な基質アミノ酸配列を有するファージミド粒子を溶出させ、好ましいリンカーをコード化したファージミド粒子に富んだプールを先ず作製する。ついでこれらのファージミド粒子を数回循環させて、コンセンサス配列(群)をコード化した粒子に富んだプールを作製する。

II. 抗体の作製

出発抗体を当該技術において有用な技術を使用して調製することができる。抗体を作製する方法の例は、以下のセクションにより詳細に記載する。

抗体は関心ある抗原に対するものである。好ましくは抗原は、生物学的に重要なポリペプチドであり、病気又は疾患を被っている哺乳動物への抗体の投与によ

りその哺乳動物に治療的利益をもたらすことができる。しかし、非ポリペプチド抗原に対応する抗体(例えば、腫瘍随伴糖脂質抗原；米国特許第5091178号を参照)もまた考えられる。

抗原がポリペプチドである場合、それは、膜貫通型分子(例えばレセプター)、例えば成長因子であってもよい。抗原の例としては、レニンのような分子；ヒト成長ホルモン及びウシ成長ホルモンを含む成長ホルモン；成長ホルモン放出因子；副甲状腺ホルモン；グルカゴン；プロテインC等の凝固因子；心房性ナトリウム利尿因子；肺サーファクタント；プラスミノゲンアクチベーター、例えばウロキナーゼ又はヒト尿もしくは組織型プラスミノゲンアクチベーター(tPA)；ボンベジン；トロンビン；造血増殖因子； α 及び β 腫瘍壊死因子；エンケファリナーゼ；ランテス(RANTES (regulated on activation normally T-cell expressed and secreted))；ヒトマクロファージ炎症タンパク質(MIP-1 α)；ヒト血清アルブミンのような血清アルブミン；ミューラー阻止物質；リラキシンA鎖；リラキシンB鎖；プロリラキシン；マウスゴナドトロピン関連ペプチド； β ラクタマーゼのような微生物タンパク質；DNアーゼ；IgE；CTLA-4のような細胞障害性Tリンパ球関連抗原(CTLA)；インヒビン；アクチビン；血管内皮増殖因子(VEGF)；ホルモン又は成長因子のレセプター；プロテインA又はD；リウマチ因子；神経栄養因子、例えば骨由来神経栄養因子(BDNF)、ニューロトロフィン-3、-4、-5、又は-6(NT-3、NT-4、NT-5又はNT-6)、又は神経成長因子、例えばNGF- β ；血小板由来成長因子(PDGF)；aFGF及びbFGFのような線維芽細胞成長因子；TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4又はTGF- β 5を含むTGF- α 及びTGF- β のようなトランスフォーミング成長因子(TGF)；インスリン様成長因子I及びII(IGF-I及びIGF-II)デス(1-3)-IGF-I(脳IGF-I)、インスリン様成長因子結合タンパク質；CD3、CD4、CD8、CD19及びCD20のようなCDタンパク質；エリスロポエチン；オステオインダクティブ因子；イムノトキシン；骨形態形成タンパク質(BMP)；インターフェロン α 、 β 及び γ のようなインターフェロン；例えばM-CSF、GM-CSF及びG-CSFのようなコロニー刺激因子(CSF)；IL-1ないしIL-10のようなインタ

ーロイキ

ン(IL)；スーパーオキシドジスムターゼ；T細胞レセプター；表面膜タンパク質；ホーミングレセプター；アドレッシン；調節タンパク質；CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4及びVCAMのようなインテグリン；HER2、HER3又はHER4レセプターのような腫瘍随伴抗原；及び上記に列挙したポリペプチドの任意のもののフラグメントが含まれる。

本発明に含まれる抗体に対する好適な分子標的には、CD3、CD4、CD8、CD19、CD20及びCD34のようなCDタンパク質；EGFレセプター、HER2、HER3又はHER4レセプターのようなErbBレセプターファミリーのメンバー；LFA-1、Mac12、p150、95、VLA-4、ICAM-1、VCAM及びその α 又は β サブユニットの何れかを含む $\alpha v/\beta 3$ インテグリンのような細胞接着分子(例えば抗CD11a、抗CD18又は抗CD11b抗体)；VEGFのような成長因子；IgE；血液型抗原；f1k2/f1t3レセプター；肥満(OB)レセプター；mplレセプター；CTLA-4；プロテインC等々が含まれる。特に好ましい標的はIgEである。

抗体を、第1の哺乳動物種由来の抗原に対し産生させる。好ましい第1の哺乳動物種はヒトである。しかし、他の哺乳動物、例えば農場用、ペット用又は動物園用の動物を意図してもよく、この場合抗体はこのような哺乳動物を処置するために使用される。第1の哺乳動物種からの抗原は、それに対する抗体を作製する目的のための天然源から単離される。しかし、以下に記載するように、抗原を含有する細胞を抗体作製の免疫原として使用することもできる。他の実施態様において、抗原は、組換えて生成されるか、他の合成法により作製される。選択された抗体は、通常、抗原に対し、十分に強い結合親和性を有している。例えば抗体は、約 1×10^{-7} M、好ましくは約 1×10^{-8} M及び最も好ましくは約 1×10^{-9} Mを越えない結合親和性(Kd)値で、第1の哺乳動物種からの抗原に結合する。抗体の親和性は、例えば飽和結合；酵素結合免疫測定法(ELISA)；及び競合アッセイ(例えばRIA)により決定される。

また、抗体は治療における有効性を評価するため、例えば他の生物学的活性ア

ッセイにかけることができる。このようなアッセイは当該技術において公知であり、標的抗原及び使用を意図した抗体に依存する。具体例には、ケラチノサイト

単層付着アッセイ、CD11aに対する混合リンパ球反応(MFR)アッセイ(各々以下の実施例において記載されている)；腫瘍成長阻害アッセイ(例えば、国際特許第89/06692号に記載されている)；抗体依存性細胞障害活性(ADCC)及び補体媒介障害活性(CDC)アッセイ(米国特許第5500362号)；及びアゴニスト活性又は造血アッセイ(WO95/27062参照)が含まれる。

関心ある抗原上の特定のエピトープに結合する抗体(例えばMHM24抗体への結合を阻害するもの)をスクリーニングするには、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow及びDavid Lane編(1988)に記載されているもののような常套的な交差ブロックアッセイを実施することができる。別法として、例えば、Champeら, J. Biol. Chem. 270:1388-1394(1995)に記載されているようなエピトープマッピングを実施して、抗体が関心あるエピトープに結合するかどうかを決定することができる。

ついで、抗体の種依存性を決定する。抗体の生成に使用される抗原相同体(相同体は「第2の哺乳動物種」からのものである)に対する抗体の結合親和性を、前掲のような技術を使用して評価する。好ましい実施態様において、第2の哺乳動物種は非ヒト哺乳動物であり、その抗体は臨床前試験において投与される。従って、第2の哺乳動物種は非ヒト霊長類、例えばアカゲザル、カニクイザル、ヒヒ、チンパンジー及びマカークである。他の実施態様において、第2の哺乳動物種は、例えば齧歯動物、ネコ又はイヌである。種依存性抗体は、通常、第2の哺乳動物種からの抗原に対し、第1の哺乳動物種からの抗原に対する結合親和性よりも、少なくとも約50倍、又は少なくとも約500倍、又は少なくとも約1000倍弱い結合親和性を有する。この結合親和性は、通常、種依存性抗体が第2の哺乳動物種の臨床前試験に有効に使用できない程のものである。

種依存性を測定するための(及び、改良された特性を有する抗体変異体を評価するための)本発明の好ましい方法は、抗体の結合親和性を定量することであるが、本発明の他の実施態様においては、種依存性抗体及び抗体変異体の一又は複

数の生物学的活性が、結合親和性の代わりに、又はこれに加えて評価される。生物学的アッセイの例は上述している。このようなアッセイは、それらが抗体の治療における有効性に関して指標を提供する場合に、特に有用である。通常、必要では

ないが、このようなアッセイで改良された特性を示す抗体は、結合親和性も高められている。よって、選択されたアッセイが結合親和性アッセイ以外の生物学的活性アッセイである本発明の一つの実施態様において、種特異性抗体は、通常、第1の哺乳動物種からの試薬を使用する対応アッセイにおける生物学的活性度よりも、少なくとも約50倍、又は少なくとも約500倍、又は少なくとも約1000倍有効性が低い、第2の哺乳動物種からの「物質」(例えば、抗原、細胞、組織、器官、又は全動物)を使用する「生物学的活性度」を有する。

ついで、種依存性抗体を変化させ、第2の哺乳動物種からの抗原に対し、種依存性抗体よりも強い結合親和性を有する抗体を作製する。抗体変異体は、好ましくは、抗原に対する種依存性抗体の結合親和性よりも、少なくとも約10倍、好ましくは少なくとも約20倍、より好ましくは少なくとも約500倍、場合によっては100~200倍強い、非ヒト哺乳動物からの抗原に対する結合親和性を有する。結合親和性の所望される又は要求されるような向上度合いは、種依存性抗体の初期結合親和性に依存する。しかし、使用されるアッセイは生物学的活性アッセイであり、抗体変異体は、好ましくは、該アッセイにおける種依存性抗体の生物学的活性度よりも、少なくとも約100倍、好ましくは少なくとも約20倍、さらに好ましくは少なくとも約50倍、場合によっては少なくとも約100~200倍良好な生物学的活性度を、選択アッセイにおいて有している。

抗体変異体を作製するために、フレームワーク領域残基の一又は複数の変更(例えば置換)に一又は複数のアミノ酸の変更(例えば置換基)を種依存性抗体に導入し、結果として第2の哺乳動物種からの抗原に対する抗体変異体の結合親和性を改良する。修飾するフレームワーク領域の例には、抗原に直接、非共有的に結合するもの(Amitら, *Science* 233:747-753 (1986)) ; CDRのコンホメーションと相互作用する／これをなすもの(Chothiaら, *J. Mo. Biol.* 196:901-917 (1987))

) ; 及び/又はVL-VH界面に関与するもの(EP239400B1)が含まれる。ある実施態様において、一又は複数のこのようなフレームワーク領域の残基が修飾されると、結果として第2の哺乳動物種からの抗原に対する抗体の結合親和性が高められる。例えば、約1～約5のフレームワーク残基が本発明のこの実施態様において変更される。場合によっては、これは、臨床前試験で使用するのに適

切な抗体変異体を産出するのに十分であり、そこで高頻度可変領域は何の変更もなされない。しかし、通常は、抗体変異体は更なる高頻度可変領域変更を含む。

変更した高頻度可変領域の残基は、ランダムに変化しており、特に第2の哺乳動物種からの抗原に対する種依存性抗体の最初の結合親和性は、このようにランダムに生成された抗体変異体が容易にスクリーニングできるようなものである。

種依存性であってもよい抗体を生成する技術、及びその技術に必要な変更点を、ここで次に詳しく述べる。

A. 抗体の調製

(i) 抗原の調製

場合によっては他の分子に抱合されていてもよい可溶性抗原又はそのフラグメントを、抗体を産生するための免疫原として使用することができる。例えばレセプターのような膜貫通型分子では、これらのフラグメント(例えばレセプターの細胞外ドメイン)を免疫原として使用することができる。あるいは、膜貫通型分子を発現する細胞を免疫原として使用することができる。このような細胞は天然源(例えば癌株化細胞)から引き出すことができ、あるいは膜貫通型分子を発現する組換え技術により形質転換した細胞であってもよい。抗体を調製するために有用な他の抗原及びその型は当業者には明らかであろう。

(i i) ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、好ましくは、関連する抗原とアジュバントを複数回皮下(s c)又は腹腔内(i p)注射することにより、非ヒト哺乳動物に産生される。免疫化されている種において免疫原性であるタンパク質、例えばスカシガイヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、又は大豆トリプシンインヒ

ビターに、二重官能性又は誘導体形成剤、例えばマレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル(システイン残基により抱合)、N-ヒドロキシスクシンイミド(リジン残基により抱合)、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、塩化チオニル、又はRとR'が異なったアルキル基である $R'N=C=NR$ を使用して、関連抗原を抱合させることが有用である。

動物を、例えばタンパク質又はコンジュゲート $100\mu g$ 又は $5\mu g$ （それぞれウサギ又はマウスの場合）を完全フロイントアジュバント3容量と併せ、この

溶液を複数部位に皮内注射することによって、抗原、免疫原性コンジュゲート又は誘導体に対して免疫化する。1ヶ月後、該動物を、完全フロイントアジュバントに入れた初回量の $1/5$ ないし $1/10$ のペプチド又はコンジュゲートを用いて複数部位に皮下注射することにより、追加免疫する。7ないし14日後に動物を採血し、抗体価について血清を検定する。動物は、力価がプラトーに達するまで追加免疫する。好ましくは、動物は、同じ抗原のコンジュゲートであるが、異なったタンパク質にコンジュゲートさせた、及び／又は異なった架橋剤を介してコンジュゲートさせたコンジュゲートで追加免疫する。コンジュゲートはまた、タンパク融合として組換え細胞培養中で調製することができる。また、ミョウバンのような凝集化剤が、免疫反応の増強のために好適に使用される。

選択された哺乳動物抗体は、通常、抗原に対し十分な強さの結合親和性を有する。例えば、抗体は、約 $1 \times 10^{-7} M$ 、好ましくは約 $1 \times 10^{-8} M$ 及び最も好ましくは約 $1 \times 10^{-9} M$ を越えない結合親和性(K_d)値で、ヒト抗-IgE抗原と結合する。抗体の親和性は酵素結合免疫測定法(ELISA)；び競合アッセイ(例えば放射線面積検定法)により測定される。

ヒト抗-IgE抗体をスクリーニングするために、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow及びDavid Lane編(1988)に記載されているような常套的な交差ブロック検定を実施することができる。別法として、例えば、Champeら, J. Biol. Chem. 270:1388-1394(1995)に記載されているようなエピトープマッピングを、結合性を測定するために使用することができる。

ポリペプチド又は抗体の効力を測定するための好ましい方法は抗体の結合親和

性の定量によるものであるが、他の実施態様においては、結合親和性に加えて、又はこれに変えて、一又は複数の抗体の生物学的特性を評価することが想定されている。このようなアッセイは、それらが抗体の治療における有効性に関して指標を提供する場合に、特に有用である。通常、必要ではないが、このようなアッセイで改良された特性を示す抗体は、結合親和性も高められている。

(I I I) モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は一つの抗原部位を認識する抗体である。それらの同一の特異性により、モノクローナル抗体は、種々の異なる抗原部位を認識する抗体を

通常含む、ポリクローナル抗体よりも有用なものとされている。

モノクローナル抗体は、Kohlerら, *Nature*, 256:495 (1975) により最初に記載されたハイブリドーマ法を用いて作製でき、又は組換えDNA法(米国特許第4816567号)によって作製することができる。

ハイブリドーマ法においては、マウス又はその他の適当な宿主動物、例えばハムスターもしくはマカークザルを上記のように免疫し、免疫化に用いられたタンパク質と特異的に結合する抗体を産生する、又は産生することのできるリンパ球を導き出す。別法として、リンパ球をインビトロで免疫することもできる。次に、リンパ球を、ポリエチレングリコールのような適当な融合剤を用いて骨髓腫細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成させる (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 590-103頁 (Academic Press, 1986))。

このようにして調製されたハイブリドーマ細胞を、融合していない親の骨髓腫細胞の増殖または生存を阻害する一又は複数の物質を好ましくは含む適当な培地に蒔き、増殖させる。例えば、親の骨髓腫細胞が酵素ヒポキサンチンゲアニジンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRT又はHPR T) を欠失するならば、ハイブリドーマのための培地は、典型的には、HGPRT-欠失細胞の増殖を妨げる物質であるヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含むであろう (HAT培地)。

好ましい骨髓腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定な高レベルの発現を支援し、HAT培地のような培地に対して感受性であ

る細胞である。これらの中でも、好ましい骨髄腫株化細胞は、マウス骨髄腫ライン、例えば、ソーク・インスティテュート・セル・ディストリビューション・センター、サンディエゴ、カリフォルニア、USAより入手し得るMOPC-21及びMPC-11マウス腫瘍、及び、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、ロックヴィル、メリーランド、USAより入手し得るSP-2又はX63-Ag8-653細胞から誘導されるものである。ヒト骨髄腫及びマウス-ヒトヘテロ骨髄腫株化細胞もまたヒトモノクローナル抗体の産生のために開示されている (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984) ; Brodeurら, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63頁、(Marcel Dekker, Inc., New

York, 1987))。

ハイブリドーマ細胞が生育している培地を、抗原に対するモノクローナル抗体の産生についてアッセイする。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降又はインビトロ結合検定、例えばラジオイムノアッセイ (RIA) 又は酵素結合免疫吸着検定 (ELISA) によって測定する。

所望の特異性、親和性、及び／又は活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が確定された後、該クローンを限界希釈法によりサブクローニングし、標準的な方法により増殖させることができる (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103頁 (Academic Press, 1986))。この目的に対して好適な培地は、例えば、D-MEM又はRPMI-1640培地を包含する。また、該ハイブリドーマ細胞は、動物において腹水症腫瘍としてインビボで増殖させることができる。

サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、例えばプロテインA-セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、又はアフィニティークロマトグラフィーのような常套的な免疫グロブリン精製法により、培地、腹水、又は血清から好適に分離される。

モノクローナル抗体をコードしているDNAは、常法を用いて (例えば、モノ

クローナル抗体の重鎖および軽鎖をコードしている遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより)即座に分離され配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの好ましい供給源となる。ひとたび分離されたならば、DNAを発現ベクター中に入れ、ついでこれを、この状況以外では免疫グロブリンタンパク質を産生しない大腸菌細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、又は骨髓腫細胞のような宿主細胞中にトランスフェクトし、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を獲得することができる。抗体の組換え生産は以下に更に詳細に説明する。

更なる実施態様において、抗体又は抗体フラグメントは、McCaffertyら, *Nature*, 348:552-554 (1990)に記載された技術を使用して産生される抗体ファージライブラリから分離することができる。Clacksonら, *Nature*, 352:624-628 (1991)及び

Marksら, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)は、ファージライブラリを使用したマウス及びヒト抗体の分離を記述している。続く刊行物は鎖シャッフリングによる高親和性(nM範囲)のヒト抗体の生産(Marksら, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992))、並びに非常に大きなファージライブラリを構築するための方策としてコンビナトリアル感染とインビボ組換え(Waterhouseら, *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993))を記述している。従って、これらの技術はモノクローナル抗体の分離に対する伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ法に対する実行可能な別法である。

DNAはまた、例えば、ヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード化配列を、相同的マウス配列の代わりに置換することにより(米国特許第4816567号; Morrisonら, *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 81:6851 (1984))、又は免疫グロブリンコード化配列に結合させることにより、修飾することができる。

典型的には、このような非免疫グロブリンポリペプチドは、抗体の定常ドメインを置換し、又は抗体の1個の抗原結合部位の可変ドメインを置換して、抗原に対する特異性を有する1個の抗原結合部位、及び異なる抗原に対する特異性を有するもう一つの抗原結合部位を含むキメラ二価抗体を作り出す。

(iv) 変異抗体の作製

一度、種依存性抗体が同定され単離されると、それは異なる抗体又は変異体の作製に有用なものとなり、ここで一又は複数のアミノ酸残基は、哺乳動物抗体の一又は複数の高頻度可変領域で変更される。これに代えて、又は加えて、フレームワーク残基の一又は複数の変更(例えば置換)を、哺乳動物抗体に導入すると、結果として、ヒトIgEに対する抗体変異体の結合親和性が改良される。修飾されるフレームワーク領域の例には、抗原に直接、非共有的に結合するもの(Amitら, *Science* 233:747-753 (1986)) ; CDRのコンホメーションと相互作用する／これを変化させるもの(Chothiaら, *J. Mo. Biol.* 196:901-917 (1987)) ; 及び／又はVL-VH界面に関与するものが含まれる(EP 2 394 01 B1)。ある実施態様において、一又は複数のこのようなフレームワーク領域の残基が修飾されると、結果としてヒト抗原に対する抗体の結合親和性が高められる。例えば、約1～約5のフレームワーク残基が本発明のこの実施態様において変更される。場合によ

っては、これは、臨床前試験で使用するのに適切な抗体変異体を産出するのに十分であり、そこで過剰可変領域においては何の変更もなされない。しかし、通常は、抗体変異体は付加的な過剰可変領域変更部位を含有する。

変更した過剰可変領域の残基はランダムに変化しており、種依存性抗体の最初の結合親和性は、ランダムに生成された抗体変異体が容易にスクリーニングできるようなものである。

抗体変異体を作製するための有用な手順の一つは、「アラニンスキャニング変異誘発」として知られている(Cunningham, B. C. 及びWells, J. A. *Science* 244:1081-1085 (1989) ; Cunningham, B. C. 及びWells, J. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 6434-6437 (1991))。ここで、一又は複数の高頻度可変領域の残基(群)を、第2の哺乳動物種からの抗原とアミノ酸との相互作用に影響を及ぼすように、アラニン又はポリアラニンで置換する。ついで、置換に対し機能的感性を示すそれら高頻度可変領域の残基(群)を、置換部位において、又は該部位に対し、さらなる又は他の変異を導入することによりリファイニングする。よって、アミノ酸配列変異が導入される部位を予め測定しておく、変異それ自体の性質を予め測定してお

く必要がない。この方法で生成された a l a-変異体を、ここに記載したようにして、それらの生物学的活性度でスクリーニングする。同様の置換がスクリーニングアラニンにより付与される所望の特性に応じて、他のアミノ酸でも行われ得る。

また本発明は、修飾のためにアミノ酸残基を同定するさらなる組織的方法を提供する。この方法に依り、第1の哺乳動物種の結合に関与する種依存性抗体における高頻度可変領域残基と第2の哺乳動物種の抗原の相同体の結合に関与する高頻度可変領域残基を同定する。これを達成するために、種依存性抗体の高頻度可変領域のアラニンスクランを行うことができ、第1及び第2の哺乳動物種に対する結合性が各 a l a-変異体について試験される。よって、第1の哺乳動物種(例えばヒト)からの抗原に対する結合に関与している高頻度可変領域の残基と、第2の哺乳動物種(例えば非ヒト)からの抗原の相同体の結合に関与しているものが同定される。好ましくは、第1の哺乳動物種(例えばヒト)からの抗原ではなく、第2の哺乳動物種(例えば非ヒト)からの抗原との結合に有意に関連している残基

(類)が修飾のための候補として選択される。他の実施態様においては、第1と第2の哺乳動物種の両方からの抗原の結合に有意に関与している残基(類)が修飾のために選択される。さらに、あまり好ましくない実施態様においては、相同的哺乳動物(非ヒト) I g Eではなく、ヒト I g Eからの抗原との結合に関与している残基が修飾のために選択される。このような修飾には関心ある残基に隣接した一又は複数の残基の挿入又は残基の欠失が伴う。しかし、通常は、修飾には他のアミノ酸残基との置換が伴う。

典型的には、「好ましい置換」の項目名で、次の表Aに示すような保存的置換で始める。このような置換により生物学的活性(例えば結合親和性)が変化する結果となるのであれば、表Aの「例示的置換」に示されるか、又はさらにアミノ酸クラスに関して以下に記載される、さらなる変化を導入して、生成物をスクリーニングする。

表A
アミノ酸残基の保存的置換

元の残基	置換基の例	好適な置換基	DNAコドン
Ala (A)	val, leu, ile	val	GCA, GCC, GCG, GCU
Arg (R)	lys, gln, asn	lys	AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, CGU
Asn (N)	gln, his, lys, arg	gln	AAC, AAU
Asp (D)	glu	glu	GAC, GAU
Cys (C)	ser	ser	UGC, UGU
Gln (Q)	asn	asn	CAA, CAG
Glu (E)	asp	asp	GAA, GAG
Gly (G)	pro, ala	ala	GGA, GGC, GGG, GGU
His (H)	asn, gln, lys, arg	arg	CAC, CAU
Ile (I)	leu, val, met, ala, phe, norleucine	leu	AUA, AUC, AUU
Leu (L)	norleucine, ile, val, met, ala, phe	ile	UUA, UUG, CUA, CUC, CUG, CUU
Lys (K)	arg, gln, asn	arg	AAA, AAG
Met (M)	leu, phe, ile	leu	AUG
Phe (F)	leu, val, ile, ala, tyr	leu	UUC, UUU
Pro (P)	ala	ala	CCA, CCC, CCG, CCU
Ser (S)	thr	thr	AGC, AGU, UCA, UCC, UCG, UCU
Thr (T)	ser	ser	ACA, ACC, ACG, ACU
Trp (W)	tyr, phe	tyr	UGG
Tyr (Y)	trp, phe, thr, ser	phe	UAC, UAU
Val (V)	ile, leu, met, phe, ala, norleucine	leu	GUA, GUC, GUG, GUU

抗体の生物学的特性におけるさらなる修飾は、(a)例えば、シート又はらせん状のコンフォメーションのような、置換領域におけるポリペプチド骨格の構造；

(b) 標的部位における分子の電荷又は疎水性度、又は(c)側鎖の嵩、を維持するその効果が有意に異なる置換を選択することにより、達成される。天然に生じる残基は、次の共通の側鎖特性に基づいてグループに分けられる：

- (1) 疎水性：ノルロイシン、met、ala、val、leu、ile；
- (2) 中性で親水性：cys、ser、thr、asn、gln；
- (3) 酸性：asp、glu；
- (4) 塩基性：his、lys、arg；
- (5) 鎖の配向に影響を及ぼす残基：gly、pro、及び
- (6) 芳香性：trp、tyr、phe

非保存的置換は、これらのクラスの一つのメンバーを他のクラスと交換することを必要とする。

アミノ酸配列変異をコードする核酸分子は、当該分野において公知の種々の方法で調製される。限定するものではないが、これらの方法には、種依存性抗体の初期に調製された変異体又は非変異体版のオリゴヌクレオチド媒介性(又は部位特異的)変異誘発、PCR変異誘発、及びカセット変異誘発が含まれる。変異体を作製するための好ましい方法は部位特異的変異誘発である(Kunkel, Proc. Natl Acad. Sci. USA 82:488 (1985)を参照)。

ある実施態様では、抗体変異体は、例えば約2ないし約15の高頻度可変領域置換から、置換された単一の高頻度可変領域の残基を含むのみである。

通常、改良された生物学的特性を有する抗体変異体は、哺乳動物抗ヒトIgE抗体のアミノ酸配列又は重鎖又は軽鎖可変ドメインのいずれかと少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは85%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%のアミノ酸配列同一性又は類似性を有するアミノ酸配列を有する。この配列に対する同一性及び類似性は、配列を整列させ、配列の最大のパーセント同一性を得るために必要ならば間隙を導入した後に、種依存性抗体残基と同一(すなわち同じ残基)又は類似(すなわち前掲の共通した側鎖特性に基づく同じグループからのアミノ酸残基)した候補配列中

のアミノ酸残基のパーセンテージとして、ここでは定義される。

あるいは、抗体変異体は、抗 I g E 抗体の重鎖及び軽鎖の C D R 領域の系統の変異により産生することができる。このような抗体変異体を産生するための好ましい手順は、ファージディスプレイを使用する親和成熟の使用を含む (Hawkins 及び Lowman ら, *Biochemistry* 30 (45):10832-10838 (1991))。バクテリオファージコートタンパク融合 (Smith, *Science* 228:1315 (1985) ; Scott 及び Smith, *Science* 249:386 (1990) ; Cwirla ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 8:309 (1990) ; Devlin ら, *Science* 249:404 (1990) ; Well 及び Lowman による総括, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2:597 (1992) ; 米国特許第 5 2 2 3 4 0 9 号) は、それらをコードするバクテリオファージ粒子の遺伝子型に、示されたタンパク質又はポリペプチドの表現型を関連付けるのに有用であることが知られている。抗体の F (a b) ドメインもまたファージ上に示されている (McCafferty ら, *Nature*, 348:552-554 (1990) ; Barbas ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978 (1991) ; Garrard ら, *Biotechnology* 9:1373 (1991))。

一価ファージディスプレイは、いくつかのファージ粒子当り一つのみの複製に、変異体の表示を制限するように、バクテリオファージコートタンパク質への融合として一組のタンパク質変異体を表示することからなる。種々のタンパク質の平衡結合親和性の改良、又は親和成熟は、ヒト成長ホルモン (Lowman & Wells, *J. Mol. Biol.* 234:564-678 (1993) ; 米国特許第 5 5 3 4 6 1 7 号)、並びに抗体の F (a b) ドメイン (Barbas ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3809 (1994) ; Yang ら, *J. Mol. Biol.* 254:392 (1995)) の場合に実証されたように、変異誘発誘発、一価ファージディスプレイ、機能性分析、及び好ましい変異の付加を連続して適用することにより、過去において達成されている。

その配列中の定められた位置で異なる多くの (10^6) タンパク質変異体のライブラリを、各々が特定のタンパク質変異体をコードする DNA を含むバクテリオファージ粒子で作成することができる。親和精製のサイクル後、固定化抗原を使用して、個々のバクテリオファージクローンを単離し、その示されたタンパク質のアミノ酸配列をその DNA から推測する。

(a) ヒト化又はヒト抗体

ヒト化は、実質的により少ない無傷のヒト可変ドメインを非ヒト種由来の対応配列によって置換したキメラ抗体を作製する技術である。ヒト化抗体は、非ヒトである供給源から導入された一又は複数のアミノ酸残基を有する。これら非ヒトアミノ酸残基は、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基としばしば呼ばれる。ヒト化は本質的に齧歯動物の相補性決定領域(CDR)又はCDR配列をヒト抗体の該当する配列に置換することによりウィンターと共同研究者 [Jonesほか, *Nature*, 321:522-525 (1986) ; Riechmannほか, *Nature*, 332:323-327 (1988) ; Verhoeyenほか, *Science*, 239:1534-1536 (1988)] の方法を使用し、行うことができる。従って、このような「ヒト化」抗体は、実質的により少ない無傷のヒト可変ドメインが非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体(米国特許第4816567号)である。本発明において実施されるところでは、ヒト化IgE抗体は、いくらかのCDR残基と場合によってはマウス抗体の類似部位からの残基によって置換されたいくらかの可能なFR残基を有する。

抗原性を軽減するには、ヒト化抗体を生成するために使用するヒトの軽鎖及び重可変ドメインの両方の選択が非常に重要である。いわゆる「ベストフィット法」では、齧歯動物抗体の可変ドメインの配列を既知のヒト可変ドメイン配列ライブラリ全体に対してスクリーニングする。齧歯動物のものと最も近いヒトの配列を次にヒト化抗体のヒトフレームワーク (FR) として受け入れる (Simsほか, *J. Immunol.* 151:2296 (1993) ; Chothiaら, *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987))。他の方法では、軽鎖又は重鎖の特定のサブグループのヒト抗体全てのコンセンサス配列から誘導される特定のフレームワークを使用する。同じフレームワークをいくつかの異なるヒト化抗体に対して使用できる (Carterほか, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992) ; Prestaほか, *J. Immunol.* 151:2623 (1993))。

更に、抗体は、抗原に対する高親和性や他の好ましい生物学的性質を保持してヒト化することが重要である。この目標を達成するべく、好ましい方法では、親及びヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列及び様々な概念的ヒト化産物の分析工程を経てヒト化抗体を調製する。特定の抗体ドメイン、例えばVH及びVLドメインのモデルは類似した配列を有するF(ab)構造に基づくコンセンサ

ス配列から別々に作成される。三次元免疫グロブリンモデルは一般的に入手可能であり、当業者にはよく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推測三次元立体配座構造を図解し、表示するコンピュータプログラムが利用可能である。これらの表示を調べることで、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の可能な役割の分析、すなわち、候補免疫グロブリンがその抗原と結合する能力に影響を及ぼす残基の分析が可能となる。例えば、実施例2におけるフラグメントF(a b)-12のモデリングにおいて、マウスMAE11を、CDR及びフレームワーク残基のインスピレーションに対するテンプレートとして使用し、分子のモデリングと関連付けて修飾し、変異体配列に至らしめる。

他の例としては、対照抗体Ma b 4 d 5を挙げることができる。ここで、モデルは、ブルックハイブンプロテインデータバンクからの、いくつかのF a b構造(登録1 F B 4、2 R H E、2 M C P、3 F A B、1 F B J、2 H F L及びI R E I)に基づいて作成された。V L及びV Hドメイン用のテンプレートとして先ずF(a b)K O Lを選択し、ついで更なる構造を主鎖原子の座標を使用してこの構造に重ね合わせる(INSIGHTプログラム、Biosym Technologies)。類似したプログラム及び技術が所望の抗体のモデリングに利用される。

分子モデリングを使用する典型的な分析は次のようにして行われる：各々の重ね合わせる構造体におけるテンプレートC α から類似体C α までの距離を、各々の与えられた残基位置から算出する。一般的に、与えられた残基の全ての(ほぼ全ての)C α -C α 距離が $\leq 1 \text{ \AA}$ であるならば、その位置はコンセンサス構造に含まれる。いくつかの場合において、 β シート状フレームワーク残基はこれらの基準を満足するが、CDRループはそうではない。これらの選択された各残基に対して、個々のN、C α 、C、O及びC β 原子の平均座標を算出し、ついでAMBERフォースフィールド(Weiner, S. J. ら, J. Amer. Chem. Soc. 106:765-784 (1984))を伴うDISCOVERプログラム(Biosym Technologies)等の商業的に利用可能なプログラムを使用し50サイクルのエネルギー最小化により非標準的結合構造(bond geometry)から偏差を補正し、C α 座標を固定する。ついで、高度に保存された残基の側鎖、例えばジスルフィド結合システイン残基を、得られたコンセンサス構造に導入する。次に、特定の抗体V L及びV Hドメインの配列を、C

D

R残基で始め、指針としてChothiaら (Chothia, C. ら, *Nature* 342:877-883 (1989)) のCDRコンホメーションの作表を使用して、導入する。側鎖のコンホメーションをFab結晶構造、回転異性体ライブラリ (Ponder, J. W. & Richards, F. M., *J. Mol. Biol.* 193:775-791 (1987)) に基づき及びパッキングを考慮して選択する。VH-CDR3は上記の基準に充当しないので、INSIGHTプログラムを使用して同様な大きさにされたループを調査し、パッキング及び溶媒暴露を考慮して使用して引き出すか、又は他の常套的かつ商業的に利用可能な技術を使用して、モデルを作製する。好ましくは5000サイクルのエネルギー最小化をモデルに施す。

このようにして、所望の抗体特性、例えば標的抗原(群)に対する親和性の増加が達成されるように、レシピエント及び移入配列からフレームワーク残基を選択して、組合せることができる。一般的に、CDR残基は抗原結合への感作に直接的かつ最も実質的に関与している。この技術は実施例2におけるF(ab)-12の作製に使用されており、そこではマウスCDR残基を分子モデリングと組み合わせて使用して、ヒト化されたマウス抗IgE抗体フラグメントが作製された。

別法として、免疫時に内因性免疫グロブリンの産生なしにヒト抗体の全レパートリーを産生することのできるトランスジェニック動物(例えば、マウス)を作ることが今は可能である。例えば、キメラ及び生殖系列突然変異体マウスにおける抗体重鎖結合領域(JH)遺伝子の同型接合除去が内因性抗体産生の完全な阻害をもたらすということが記載されている。このような生殖系列突然変異体マウスでのヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子列の転移は、抗原投与時にヒト抗体の産生をもたらすであろう。Jakobovitsら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993) ; Jakobovitsら, *Nature* 362:255-258 (1993) ; Bruggermanら, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993) ; 及びDuchosalら, *Nature* 355:258 (1992)。ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリから取り出すこともできる (Hoogenboomら, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991) ; Marksら, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991) ; Vaughanら, *Nature Biotech* 14:309 (1996))。

(b) 更なる修飾

抗体変異体の生成に続いて、種依存性抗体に対するその分子の生物学的活性を

測定する。上で見たように、これには結合親和性及び／又は他の抗体の生物学的活性の測定が含まれる。本発明の好ましい実施態様では、抗体変異体のパネルを上述のようにして調製し、第2の哺乳動物種からの抗原に対する結合親和性でスクリーニングする。この最初のスクリーニングで選択された一又は複数の抗体変異体を、場合によっては一又は複数のさらなる生物学的活性アッセイにかけ、結合親和性が高められた抗体変異体(類)が臨床前実験等に実際に有用であることを確かめる。好ましい実施態様において、抗体変異体は、種依存性抗体と類似した結合親和性を有する第1の哺乳動物種からの抗原に結合する能力を保持している。これは、抗ヒト抗体からの抗原の結合に関与する高頻度可変領域を変更することを避けることにより達成される。他の実施態様において、抗体変異体は第1の哺乳動物種とは有意に変更された結合親和性を有する(例えば、その抗原に対する結合親和性は好ましくはより良好であるが、種依存性抗体よりは悪い)。

このようにして選択された抗体変異体に、しばしば抗体の意図する用途に応じて、更なる修飾を施す。このような修飾は、アミノ酸配列の変更、異種ポリペプチド(類)への融合、及び／又は共有結合的修飾、例えば以下に詳細に述べるものを含む。アミノ酸配列の変更に関しては、修飾の例を上記に詳細に示した。例えば、抗体変異体の適切なコンホメーションの保持に関与しない任意のシステイン残基を、一般的にはセリンで置換し、分子の酸化安定性を改良し、異常な架橋を防止する。逆に、(a)システイン結合を抗体に付加してその安定性を改良する(特に抗体が例えばFvフラグメントのような抗体フラグメントである場合)。他のタイプのアミノ酸変異体は、変更したグリコシル化パターンを有する。これは、抗体中に見出される一又は複数の炭水化物部分を欠失させ、及び／又は抗体中に存在しない一又は複数のグリコシル化部位を加えることにより達成される。抗体のグリコシル化は、典型的にはN結合又はO結合のいずれかである。N結合とは、アスパラギン酸残基の側鎖に炭水化物部分が付着することを指す。トリペプチド配列、アスパラギン-X-セリン及びアスパラギン-X-スレオニン(ここでXは

プロリン以外の任意のアミノ酸である)は、アスパラギン側鎖に炭水化物部分を酵素的に付着させる認識配列である。よって、ポリペプチド中にこれらトリペプチド配列のいずれかが存在すると、潜在的グリコシル化部位が生じる。○結合グリコシル化

とは、エーテル酸素を介しての糖の付着を指す；例えば、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリン又はスレオニンに結合したN-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、フコース又はキシロースであり、但し5-ヒドロキシプロリン又は5-ヒドロキシリジンも使用してもよい。抗体へのグリコシル化部位の付加は、一又は複数の上述のトリポリペプチド配列を含有するように(N結合グリコシル化部位に対して)、アミノ酸配列を変更することにより簡便に達成される。元の抗体の配列に、一又は複数のセリン又はスレオニン残基を付加、又はこれらにより置換することにより、変更することもできる(○結合グリコシル化部位に対して)。

(v) 抗体フラグメント

抗体フラグメントを生産するために様々な技術が開発されている。伝統的には、これらのフラグメントは、無傷の抗体のタンパク分解性消化を介して誘導される(例えば、Morimotoら, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) 及びBrennanら, *Science*, 229:81 (1985) を参照されたい)。しかし、これらのフラグメントは現在は組換え宿主細胞により直接生産することができる。例えば、抗体フラグメントは上において検討した抗体ファージライブラリから分離することができる。別法として、F(a b')₂-SHフラグメントは大腸菌から直接回収することができ、化学的に結合させてF(a b')₂-SHフラグメントを形成することができる(Carterら, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992))。他のアプローチ法では、F(a b')フラグメントを組換え宿主細胞培養から直接分離することができる。抗体フラグメントの生産のための他の方法は当業者には明らかであろう。他の実施態様では、選択抗体は単鎖F_vフラグメント(scFV)である(PCT特許出願国際公開第93/16185号)。

(vi) 多重特異性抗体

多重特異性抗体は、少なくとも二つの異なる抗原に対して特異的に結合するものである。このような分子は通常は二つの異なった抗原を結合させるのみであるが(すなわち、二重特異性抗体、B s A b)、三重特異性抗体のような更なる特異性を持つ抗体もここで使用される場合この表現に包含される。B s A bの例には、一方の腕が腫瘍細胞抗原に向けられ他方の腕が細胞毒性トリガー分子に向けられたもの、例えば抗F c γ R I / 抗CD15、抗p185^{HER2} / F c γ R I I I (C D

16)、抗CD3 / 抗悪性B細胞(1D10)、抗CD3 / 抗p185^{HER2}、抗CD3 / 抗p97、抗CD3 / 抗腎臓細胞ガン腫、抗CD3 / 抗OVCA R-3、抗CD3 / L-D1 (抗大腸ガン腫)、抗CD3 / 抗メラニン細胞刺激ホルモン類似体、抗EGFレセプター / 抗CD3、抗CD3 / 抗CAMA1、抗CD3 / 抗CD19、抗CD3 / MoV18、抗神経細胞接着分子(NCAM) / 抗CD3、抗葉酸塩結合タンパク質(FBP) / 抗CD3、抗パン(pan) 癌腫関連抗原(AMOC-31) / 抗CD3; 腫瘍抗原に特異的に結合する一つの腕と毒素に結合する一つの腕を持つB s A b、例えば、抗サポリン / 抗Id-1、抗CD22 / 抗サポリン、抗CD7 / 抗サポリン、抗CD38 / 抗サポリン、抗CEA / 抗リシンA鎖、抗CD22 / 抗サポリン、抗CD7 / 抗サポリン、抗CD38 / 抗サポリン、抗CEA / 抗リシンA鎖、抗インターフェロン α (IFN- α) / 抗ハイブリドーマイディオタイプ、抗CEA / 抗ピンカアルカロイド; (マイトマイシンホスフェートのプロドラッグのマイトマイシンアルコールへの転換を触媒する) 抗CD30 / 抗アルカリホスファターゼのような酵素活性化プロドラッグを転換するためのB s A b; 抗フィブリン / 抗組織プラスミノゲンアクチベーター(tPA)、抗フィブリン / 抗ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター(uPA) のような線維素溶解剤として使用することができるB s A b; 抗低密度リポタンパク質(LDL) / 抗F c レセプター (例えばF c γ R I、F c γ R I I 又はF c γ R I I I) のような細胞表面レセプターへ免疫複合体をターゲティングするためのB s A b; 感染性疾患の治療に使用されるB s A b、例えば抗CD3-抗単純ヘルペスウィルス(HSV)、抗T細胞レセプター: CD3複合体 / 抗インフ

ルエンザ、抗FcγR／抗HIV；抗CEA／抗EOTUBE、抗CEA／抗DPTA、抗p185^{HER2}／抗ハプテンのようなインビトロ又はインビボでの腫瘍検出のためのBsAb；ワクチンアジュバントとしてのBsAb；及び抗ウサギIgG／抗フェリチン、抗西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)／抗ホルモン、抗ソマトスタチン／抗サブスタンスP、抗HRP／抗FITC、抗CEA／抗βガラクトシダーゼのような診断ツールとしてのBsAbが含まれる。三重特異性抗体の例には、抗CD3／抗CD4／抗CD37、抗CD3／抗CD5／抗CD37及び抗CD3／抗CD8／抗CD37が含まれる。二重特異性抗体は全長抗体又は抗体フラ

グメント(例えばF(ab')₂二重特異性抗体)として調製することができる。

二重特異性抗体を作成する方法は当分野において既知である。全長二重特異性抗体の伝統的な産生は免疫グロブリン重鎖－軽鎖対の同時発現に基づき、ここで二つの該鎖は異なる特異性を持っている(Millsteinら, *Nature*, **305**:537-539(1983))。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖が無作為に取り揃えられているため、これらのハイブリドーマ(四部雑種)は10個の異なる抗体分子の可能性ある混合物を産生し、そのうちただ一つが正しい二重特異性構造を有する。通常、アフィニティークロマトグラフィー工程により行われる正しい分子の精製は、かなり煩わしく、生成物収率は低い。同様の方法が国際公開第WO93/08829号及びTrautneckerら、*EMBO J.* **10**:3655-3659(1991)に開示されている。

異なったアプローチ法によると、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン(抗原－抗体結合部位)を、免疫グロブリン不変ドメイン配列と融合させる。該融合は好ましくは、少なくともヒンジの一部、CH2及びCH3領域を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとの融合である。軽鎖の結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(CH1)を、融合の少なくとも一つに存在させることが望ましい。免疫グロブリン重鎖の融合、そして、望まれるならば免疫グロブリン軽鎖をコードしているDNAを、別個の発現ベクター中に挿入し、適当な宿主生物に同時トランスフェクトする。これにより、組立に使用される三つのポリペプチド鎖の等しくない比率が最適な収率を提供する態様において、三つのポリペプチド

フラグメントの相互の割合の調節に大きな融通性が与えられる。しかし、少なくとも二つのポリペプチド鎖の等しい比率での発現が高収率をもたらすとき、又は、その比率が特に重要性を持たないときは、2または3個全てのポリペプチド鎖のためのコード化配列を一つの発現ベクターに挿入することが可能である。

このアプローチ法の好適な実施態様において、二重特異性抗体は、第一の結合特異性を有する一方の腕のハイブリッド免疫グロブリン重鎖、及び他方の腕のハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第二の結合特異性を提供する)で構成される。二重特異性分子の半分しか免疫グロブリン軽鎖がないことで容易な分離法が提供されるため、この非対称的構造は、所望の二重特異性化合物を不要な免疫グロブリン鎖の組み合わせから分離することを容易にすることが分かった。この

アプローチ法は、WO 94/04690に開示されている。二重特異性抗体を作製する更なる詳細については、例えばSureshら, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986)を参照されたい。

国際公開WO 96/27011に記載された他のアプローチ法によれば、一对の抗体分子間の界面を操作して、組換え細胞培養から回収されるヘテロダイマーのパーセントを最大にすることができる。好適な界面は抗体定常ドメインのCH3ドメインの一部を少なくとも含む。この方法では、第1抗体分子の界面からの一又は複数の小アミノ酸側鎖がより大きな側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似したサイズの相補的「キャビティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの(アラニン又はスレオニン)と置き換えることにより第2の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

二重特異性抗体は、架橋した又は「ヘテロコンジュゲート」抗体もまた含む。例えば、ヘテロコンジュゲートの抗体の一方はアビジンに結合され、他方はビオチンに結合され得る。そのような抗体は、例えば、不要の細胞に対する免疫系細胞を標的とするため(米国特許第4676980号)、及びHIV感染の治療のために提案された(WO 91/00360、WO 92/00373、及びEP 03

089)。ヘテロコンジュゲート抗体は、任意の簡便な架橋法を用いて作製することができる。好適な架橋剤は当該分野において良く知られており、幾つかの架橋技術と共に米国特許第4676980号に開示されている。

抗体フラグメントから二重特異性抗体を産生する技術もまた文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennanら, *Science*, **229**:81 (1985) は無傷の抗体をタンパク分解性に切断してF(a b')₂フラグメントを産生する手順を記述している。これらのフラグメントは、ジチオール錯体形成剤亜硫酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルフィド形成を防止する。産生されたF(a b')フラグメントはついでチオニトロベンゾアート(TNB)誘導体に転換される。F a b'-TNB誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元によりF a b'-チ

オールに再転換し、他のF a b'-TNB誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。作られた二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用することができる。

最近の進歩により、大腸菌からのF a b'-SHフラグメントの直接の回収が容易になり、これは化学的に結合して二重特異性抗体を形成することができる。Shalabyら, *J. Exp. Med.*, **175**:217-225 (1992) は完全にヒト化された二重特異性抗体F(a b')₂分子の製造を記述している。各F a b'フラグメントは大腸菌から別個に分泌され、インビトロで定方向化学共役させて二重特異性抗体を形成する。このようにして形成された二重特異性抗体は、正常なヒトT細胞及びE r b B 2レセプターが過剰発現する細胞に結合可能で、ヒト胸部腫瘍標的に対するヒト細胞障害性リンパ球の細胞溶解活性の誘因となる。

組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体フラグメントを作成し分離する様々な方法もまた記述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して生産される。Kostelnyら, *J. Immunol.*, **148** (5):1547-1553 (1992)。F o s 及びJ u nタンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なった抗体のF a b'部分に結合させる。抗体ホモダイマーをヒンジ領域で還元してモノマーを形成し、ついで再酸化して抗体ヘテロダイマーを形成する

。この方法はまた抗体ホモダイマーの生産に対して使用することができる。

Hollingerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体フラグメントを作成する別のメカニズムを提供した。フラグメントは、同一鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするのに十分に短いリンカーにより軽鎖可変ドメイン(V_L)に重鎖可変ドメイン(V_H)を結合してなる。従って、一つのフラグメントのV_H及びV_Lドメインは他のフラグメントの相補的V_L及びV_Hドメインと強制的に対形成させられ、2つの抗原結合部位を形成する。単鎖F_v(s F_v)ダイマーを使用する他の二重特異性抗体フラグメント製造方策もまた報告されている。Gruberら, J. Immunol. 152:5368 (1994) を参照されたい。

二価より多い抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。TuttらJ. Immunol. 147:60 (1991)。

(v i i) エフェクター機能の設計

本発明の抗体をエフェクター機能について改変し、抗体の、例えばI g Eへの結合における効能を増強することが望ましい。例えば、システイン残基(群)をF_c領域に導入して、この領域における鎖間ジスルフィド結合の形成を許容する。このようにして産生されたホモダイマー抗体は改善されたインターナリゼーション能力及び／又は増加した補体媒介細胞死滅及び抗体依存性細胞障害活性(ADCC)を有しうる。Caronら, J. Exp. Med. 176:1191-1195 (1992) 及びShopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992) を参照されたい。別法として、二重F_c領域を有し、よって増強された補体溶解及びADCC能を有する抗体を設計することができる。Stevensonら, Anti-cancer Drug Design 3:219-230 (1989) を参照。

(v i i i) 免疫コンジュゲート

また本発明は、ここで記載され、細胞障害剤、例えば化学療法剤、毒素(例えば、細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素又はそれらのフラグメント)、又は放射性同位元素(すなわち、放射性コンジュゲート)に抱合された抗体を含有する免疫コンジュゲートに関する。

このような免疫コンジュゲートの産生に有用な化学療法剤は上述している。使

用可能な酵素活性毒素及びそれらのフラグメントには、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント外毒素A鎖(シュードモナス・アエルギノサ(*Pseudomonas aeruginosa*)由来)、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシン(modeccin) A鎖、 α サルシン(sarcin)、アロイライト・フォルジ(*Aleurites fordii*)タンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、フィトラカ・アメリカーナ(*Phytolacca americana*)タンパク質(PAP I、PAP II及びPAP-S)、モモルディカ・チャランティア(*Momordica charantia*)インヒビター、クリン(curin)、クロチン、サパオナリア(*sapaonaria*)公定インヒビター、ゲロニン(gelonin)、マイトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン、エノマイシン及びトリコセセンス(tricothecenes)が含まれる。種々の放射性核種も放射性コンジュゲート抗体の生成に利用できる。具体例には ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 及び ^{186}Re が含まれる。

抗体と細胞障害剤のコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリン

グ剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオナート(SPDP)、イミノチオラン(IT)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミデートHCL)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス-p-(アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-p(ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン)、ジイソシアナート(例えば、トリエン-2, 6-ジイソシアナート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitettaら、*Science* 238:1098(1987)に記載されているようにして調製することができる。炭素-14標識1-イソチオシアナートベンジル-3-メチルジエチレン-トリアミン五酢酸(MX-DTPA)が抗体に放射性核種をコンジュゲートするためのキレート剤の例である。国際公開第94/11026号を参照。

他の実施態様では、腫瘍のプレターゲットングに利用するために、「レセプター」(ストレプトアビジンのような)に抗体をコンジュゲートしてもよく、ここで

、抗体－レセプターコンジュゲートを患者に投与し、続いてキレート剤を使用し、循環から未結合コンジュゲートを除去し、細胞障害剤(例えば放射性核種)にコンジュゲートしている「リガンド」(例えばアビジン)を投与する。

(ix) 免疫リポソーム

ここで開示されている抗体変異体は、免疫リポソームとして調製することもできる。抗体を含むリポソームは、例えばEpsteinら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688(1985) ; Hwangら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030(1980) ; 及び米国特許第4485045号及び同4544545号に記載されているような当該分野において公知の方法により調製される。循環時間を増大したリポソームは米国特許第5013556号に開示されている。

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びPEG誘導体化ホスファチジリエタノールアミン(PEG-PE)を含有する脂質組成物を用いた逆相蒸発法により産生することができる。リポソームは孔の大きさが定められたフィルターを通して押し出され、所望の直径を有するリポソームが産出

される。本発明の抗体のFab'フラグメントは、ジスルフィド交換反応を介して、Martinら, J. Biol. Chem. 257:286-288(1982)に記載されているようにしてリポソームにコンジュゲートすることができる。場合によっては、化学療法剤(例えばドキソルビシン)がリポソーム内に包含されている。Gabizonら, J. National Cancer Inst. 81(19):1484(1989)を参照。

(x) 抗体依存性酵素媒介性プロドラッグ治療法(ADEPT)

また、本発明の抗体は、プロドラッグ(例えばペプチジル化学療法剤、国際公開第81/01145号を参照)を活性抗癌剤に転化させるプロドラッグ活性酵素に抗体をコンジュゲートさせることにより、ADEPTにおいて使用することができる。例えば国際公開第88/07378号及び米国特許第4975278号を参照。

ADEPTに有用な免疫コンジュゲートの酵素成分には、より活性な細胞障害形態に転化するようにプロドラッグに作用可能な任意の酵素が含まれる。

限定するものではないが、この発明の方法に対して有用な酵素には、ホスファ

ート含有プロドラッグを遊離の薬剤に転化するのに有用なアルカリ性ホスファターゼ；スルファート含有プロドラッグを遊離の薬剤に転化するのに有用なアリースルファターゼ；非毒性5-フルオロシトシンを抗癌剤に転化するのに有用なシトシンデアミナーゼ；例えばペプチド含有プロドラッグを遊離の薬剤に転化するのに有用なセラチアプロテアーゼ、サーモリシン、サブチリシン、カルボキシペプチダーゼ及びカテプシン(例えば、カテプシンB及びL)のようなプロテアーゼ；D-アミノ酸置換基を含有するプロドラッグの転化に有用なD-アラニルカルボキシルペプチダーゼ；グリコシル化プロドラッグを遊離の薬剤に転化するのに有用なノイラミニダーゼ及びβガラクトシダーゼのような炭水化物切断酵素；βラクタムで誘導体化された薬剤を遊離の薬剤に転化させるのに有用なβラクタマーゼ；及びそれぞれフェノキシルアセチル又はフェニルアセチル基でそれらのアミノ性窒素において誘導体化された薬剤を遊離の薬剤に転化するのに有用なペニシリンVアミダーゼ又はペニシリンGアミダーゼのようなペニシリンアミダーゼが含まれる。あるいは、当該分野でアブザイムとしても知られている酵素活性を持つ抗体を用いて本発明のプロドラッグを遊離の活性薬物に転換することができる

(Massey, *Nature* **328**:457-458 (1987))。抗体-アブザイムコンジュゲートは、腫瘍細胞集団へのアブザイムの送達についてここで記載しているようにして調製することができる。

この発明の酵素は、当該分野においてよく知られている技術、例えば上において検討したヘテロ二官能性架橋試薬を使用することにより、抗体変異体に共有的に結合させることができる。あるいは、本発明の酵素の少なくとも機能的に活性な部位に結合した、本発明の抗体の少なくとも抗原結合領域を含有する融合タンパク質を、当該分野においてよく知られている組換えDNA技術を使用して作成することができる(Neubergerら, *Nature* **312**:604-608 (1984))。

(x i) 抗体-サルベージレセプター結合エピトープ融合

本発明のある実施態様においては、例えば腫瘍浸透性を増大させるために無傷の抗体よりも抗体フラグメントを使用することが望ましい。この場合、その血清半減期を増大させるために抗体フラグメントを改変することが望ましい。これは

、例えば、抗体フラグメントにサルベージレセプター結合エピトープを導入することにより(例えば、抗体フラグメント中の適当な領域の突然変異により、あるいはついで抗体フラグメントの何れかの末端又は中央に、例えばDNA又はペプチド合成により、融合されるペプチドタグ内にエピトープを導入することにより)、達成できる。

サルベージレセプター結合エピトープは、好ましくは、Fcドメインの一又は二つのループからの一又は複数のアミノ酸残基が抗体フラグメントの類似位置に移される領域を構成する。更により好ましくは、Fcドメインの一又は二つのループの3又はそれ以上の残基が移される。なお更に好ましくは、エピトープはFc領域(例えばIgGの)のCH2ドメインから取上げられ、抗体のCH1、CH3、又はVH領域、あるいは一以上のそのような領域に移される。別法として、エピトープをFc領域のCH2ドメインから取上げ、抗体フラグメントのCL領域又はVL領域、又は両方に移す。

(ix) 抗体の他の共有結合的修飾

抗体の共有結合的修飾は本発明の範囲内に含まれる。それらは、化学合成により、又は適用可能ならば抗体の酵素的もしくは化学的開裂により製造し得る。他

のタイプの抗体の共有結合的修飾は、抗体の標的とするアミノ酸残基を、選択した側鎖又はNもしくはC末端残基と反応できる有機の誘導体化剤と反応させることにより、分子中に導入される。

システイニル残基は最も一般的には α -ハロアセタート(及び対応するアミン)、例えば、クロロ酢酸又はクロロアセトアミドと反応し、カルボキシメチル又はカルボキシアミドメチル誘導体を生じる。システイニル残基も又ブロモトリフルオロアセトン、 α -ブromo- β -(5-イミドゾイル)プロピオン酸、クロロアセチルホスファート、N-アルキルマレイミド、3-ニトロ-2-ピリジルジスルフィド、メチル-2-ピリジルジスルフィド、p-クロロ水銀ベンゾアート、2-クロロ水銀-4-ニトロフェノール、又はクロロ-7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾールとの反応によって誘導体化される。

ヒスチジル残基はpH 5.5-7.0でジエチルピロカルボナートとの反応によ

って誘導体化されるが、これは、この試薬がヒスチジル側鎖に対して相対的に特異的であるからである。パラ-プロモフェナシルブロミドも又有用である；この反応は、好ましくはpH 6.0で0.1Mのカコジル酸ナトリウム中で行われる。

リジニル及びアミノ末端残基はスクシン又は他のカルボン酸無水物と反応させられる。これらの試薬を用いた誘導化は、リシニル残基の電荷を逆転させる効果を有する。 α -アミノ含有残基を誘導体化する他の適当な試薬は、イミドエステル、例えばメチルピコリンイミダート、リン酸ピリドキサル、ピリドキサル、クロロボロヒドリド、トリニトロベンゼンスルホン酸、O-メチルイソ尿素、2,4-ペンタンジオン、及びグリオキシラートを用いたトランスアミナーゼにより触媒される反応が含まれる。

アルギニル残基は一つあるいは幾つかの従来の試薬との反応によって修飾され、とりわけ、フェニルグリオキサール、2,3-ブタンジオン、1,2-シクロヘキサジオン及びニンヒドリンがある。アルギニン残基の誘導体化は、グアニジン官能基の高いpKaのために反応がアルカリ性条件下で行われることを必要とする。更に、これらの試薬はリジンの基並びにアルギニンのエプシロン-アミノ基と反応する。

チロシル残基の特異的修飾は、芳香族ジアゾニウム化合物又はテトラニトロメタンとの反応によるチロシル残基内へのスペクトル標識の導入に特に興味を持ってなされる。最も一般的には、N-アセチルイミジゾールとテトラニトロメタンを使用して、それぞれがO-アセチルチロシル種と3-ニトロ誘導体を形成する。チロシル残基はラジオイムノアッセイ用の標識化タンパクを調製するために ^{125}I 又は ^{131}I を用いてヨウ素化される。

カルボキシル側基(アスパルチル又はグルタミル)がカルボジイミド($\text{R}-\text{N}=\text{C}=\text{N}-\text{R}'$) (ここで、RとR'は異なったアルキル基)、例えば、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリニル-4-エチル)カルボジイミド又は1-エチル-3-(4-アゾニア-4,4-ジメチルペンチル)カルボジイミドとの反応によって選択的に修飾される。さらに、アスパルチル及びグルタミル残基は、アンモニウムイオンと反応

させることによりアスパラギニル及びグルタミニル残基に転化される。

グルタミニル及びアスパラギニル残基はしばしば各々対応するグルタミル及びアスパルチル残基にそれぞれ脱アミド化される。これらの残基は中性又は塩基性条件下で脱アミド化される。これらの残基の脱アミド化型は本発明の範囲内に入る。

その他の修飾は、プロリンとリジンのヒドロキシル化、セリル又はスレオニル残基のヒドロキシル基のホスホリル化、リジン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖の α アミノ基のメチル化(T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, PP. 79-86 (1983))、N末端アミンのアセチル化及び任意のC末端カルボキシル基のアミド化を含む。

共有結合的修飾の他のタイプは、抗体にグリコシドを酵素的又は化学的に結合させることを含む。これらの手順は、N又はO結合グルコシル化のためのグリコシル化能を有する宿主細胞中で抗体を生産させる必要がないという点で有利である。用いられる結合様式に応じて、糖(類)は、(a)アルギニンとヒスチジンに；(b)遊離のカルボキシル基に；(c)遊離のスルフヒドリル基、例えばシステインのものに；(d)セリン、スレオニン又はヒドロキシプロリンのもののような遊離のヒドロキシル基に；(e)フェニルアラニン、チロシン又はトリプトファンのような芳香族残基；又は(f)グルタミンのアミノ基に結合される。これらの方法は1987年9月11日公開の国際公開第87/05330号及びAplin及びWriston,

CRC Crit. Rev. Biochem., 259-306 (1981)に記載されている。

抗体上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的又は酵素的になされる。化学的脱グリコシル化は、化合物トリフルオロメタンスルホン酸、又は等価な化合物への抗体の曝露を必要とする。この処理により、該抗体を無傷のまま残しながら、結合糖(N-アセチルグルコサミン又はN-アセチルガラクトサミン)を除く殆ど又は全ての糖の開裂がなされる。化学的脱グリコシル化は、Hakimuddinほか, *Arc h. Biochem Biophys.*, 259:52 (1987) 及びEdgeほか, *Anal. Biochem.*, 118:131 (1981) により記載されている。抗体上の炭水化物部分の酵素的開裂は、Thotakura

ほか, Meth. Enzymol. 138:350 (1987) に記載されているように、種々のエンド及びエキソグリコシダーゼを使用して達成することができる。

抗体の共有結合的修飾の他のタイプは、米国特許番号 4 6 4 0 8 3 5 号；第 4 4 9 6 6 8 9 号；第 4 3 0 1 1 4 4 号；第 4 6 7 0 4 1 7 号；第 4 7 9 1 1 9 2 号又は第 4 1 7 9 3 3 7 号に記載されているように、抗体を、種々の非タンパク性ポリマーの一つ、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンに結合させることを含む。

B. ベクター、宿主細胞及び組換え方法

本発明は、ここで開示されている抗体変異体をコードしている核酸を分離し、核酸を含有するベクター及び宿主細胞、及び抗体変異体を生成するための技術を提供する。

抗体変異体を組換え生成するために、それをコードする核酸を単離し、更なるクローニング (DNA の増幅) 又は発現のために複製可能なベクター内に挿入する。モノクローナル抗体をコードしている DNA は直ぐに分離され、通常の手順を使用して (例えば、抗体変異体の重鎖と軽鎖をコードしている遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用して) 配列決定される。多くのベクターが利用できる。限定されるものではないが、ベクター成分には一般に次のものの一又は複数が含まれる：シグナル配列、複製開始点、一又は複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモータ、及び転写終結配列。

(i) シグナル配列成分

本発明の抗体変異体は組換え手法によって生産されるだけでなく、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいはポリペプチドの N 末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合ペプチドとしても生産される。好ましく選択された異種シグナル配列は宿主細胞によって認識され加工される (すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される) ものである。原核生物宿主細胞は天然抗体シグナル配列を認識し加工せず、シグナル配列は、例えばアルカリ性ホスファターゼ、ペニシリナーゼ、1 p p あるいは熱安定なエンテロトキシン II リーダーの群から選択される原核生物シグナル配列により置換され

る。酵母の分泌に関しては、天然シグナル配列は、酵母インペルターゼリーダー、アルファ因子リーダー (酵母菌属 (*Saccharomyces*) 及び *Kluyveromyces* α 因子リーダーを含む)、又は酸フォスフォターゼリーダー、白体 (*C. albicans*) グルコアミラーゼリーダー又は国際特許第WO90/13646号に記載されているシグナルにより置換され得る。哺乳動物細胞の発現においては、哺乳動物シグナル配列、並びにウイルス分泌リーダー、例えば単純ヘルペス gD シグナルが有用である。

このような前駆体領域のDNAにおいては、抗体変異体をコードするDNAにリーディングフレームが結合される。

(i i) 複製開始点成分

発現とクローニングベクターは共に一又は複数の選択された宿主細胞においてベクターの複製を可能にする核酸配列を含む。一般に、この配列はクローニングベクターにおいて、宿主染色体DNAとは独立にベクターが複製することを可能にするものであり、複製開始点又は自律的複製配列を含む。このような配列は多くの細菌、酵母及びウイルスに対してよく知られている。プラスミド pBR322 に由来する複製開始点は大部分のグラム陰性細菌に好適であり、2 μ プラスミド開始点は酵母に適しており、様々なウイルス開始点 (SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSV又はBPV) は哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。一般には、哺乳動物の発現ベクターには複製開始点成分は不要である (SV40 開始点が典型的には初期プロモータを有しているため用いられる)。

(i i i) 選択ゲノム成分

発現及びクローニングベクターは、選択的マーカーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は、(a) アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサートあるいはテトラサイクリンのような抗生物質あるいは他の毒素に耐性を与え、(b) 栄養要求性欠陥を補い、(c) 例えばバシリ (*Bacilli*) に対する遺伝子コード D-アラニンラセマーゼのような、複合培地から得られない重要な栄養素を供給する、タンパク質をコードする。

選択技術の一例においては、宿主細胞の成長を抑止する薬品が用いられる。異種性遺伝子で首尾よく形質転換した細胞は、抗薬品性を付与し、選択摂生を生存するタンパク質を生産する。このような優性選択の例としては、ネオマイシン、ミコフェノール酸又はハイグロマイシンが使用される。

哺乳動物の細胞に適切な選択的マーカーの他の例は、DHFR、チミジンキナーゼ、金属結合性タンパク質-I及びII、例えば霊長類の金属結合性タンパク質、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼを捕捉するのに適切な細胞を同定することができるものである。

DHFR選択遺伝子によって形質転換された細胞は、まず、DHFRの競合的アンタゴニストであるメトトリキセート(Mtx)を含む培地において形質転換物の全てを培養することで同定される。野生型DHFRを用いた場合の好適な宿主細胞は、DHFR活性に欠陥のあるチャイニーズハムスター卵巣(CHO)株化細胞である。

あるいは、抗体をコードするDNA配列、野生型DHFRタンパク質、及びアミノグリコシド-3'-ホスホトランスフェラーゼ(APH)のような他の選択的マーカーで形質転換あるいは同時形質転換した宿主細胞(特に、内在性DHFRを含む野生型宿主)は、カナマイシン、ネオマイシンあるいはG418のようなアミノグリコシド抗生物質のような選択可能マーカーの選択剤を有する培地における細胞成長により選択することができる(米国特許第4965199号)。

酵母中での使用に好適な選択遺伝子は酵母プラスミドYrp7に存在するtrp1遺伝子である(Stinchcombら, Nature, 282:39(1979))。trp1遺伝子は、例えば、ATCC第44076号あるいはPEP4-1のようなトリプトファン内で成長する能力に欠ける酵母の突然変異株に対する選択マーカーを提供するJones, Genetics, 85:12(1977)。酵母宿主細胞ゲノムにtrp1損傷が存在する

ことは、トリプトファンの不存在下における成長による形質転換を検出する有効な環境を提供する。同様に、Leu2欠陥を有する酵母株(ATCC20,622あるいは38,626)は、Leu2遺伝子を有する既知のプラスミドによって補完される。

更に、1.6 μ mの円形プラスミドpKD1由来のベクターは、クルイヴェロ

マイシス (*Kluyveromyces*) 酵母の形質転換に用いることができる。また、組換え子ウシのキモシンの大量生産のための発現系が *K. ラクティス* (*lactis*) に対して報告されている。Van den Berg, *Bio/Technology*, 8:135 (1990)。クルイヴェロマイシスの工業的な菌株からの、組換えによる成熟したヒト血清アルブミンを分泌する安定した複数コピー発現ベクターも開示されている。Fleerほか., *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991)。

(i v) プロモータ成分

発現及びクローニングベクターは、通常、宿主生物によって認識され、抗体核酸に作動可能に結びついているプロモータを含む。原核生物での使用に好適なプロモータは、*p h o A* プロモータ、 β -ラクタマーゼ及びラクトースプロモータ系、アルカリ性ホスファターゼ、トリプトファン (*t r p*) プロモータ系、及びハイブリッドプロモータ、例えば *t a c* プロモータを含む。しかし、他の既知の細菌プロモータも好適である。細菌系で使用するプロモータもまた抗体をコードするDNAと作動可能に結合したシャイン・ダルガーノ (*S. D.*) 配列を有する。

真核生物に対してもプロモータ配列が知られている。実質的に全ての真核生物の遺伝子は、転写開始部位から25ないし30塩基上流に位置するATリッチ領域を有する。多数の遺伝子の転写開始位置から70ないし80塩基上流に見出される他の配列は、Nが任意のヌクレオチドであるCNC A A T領域である。大部分の真核生物遺伝子の3'末端には、コード配列の3'末端にポリA尾部が付加されていることを示すシグナルであるA A T A A A配列がある。これらの配列は全て真核生物の発現ベクターに適切に挿入される。

酵母宿主と共に用いて好適なプロモータ配列の例としては、3-ホスホグリセラートキナーゼ、又は他の糖分解酵素、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセ

レートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオセリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼが含まれる。

他の酵母プロモータとしては、成長条件によって転写が制御される付加的利点を有する誘発的プロモータであり、アルコールデヒドロキナーゼ2、イソサイトクロムC、酸ホスファターゼ、窒素代謝と関連する分解性酵素、金属結合性タンパク質、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、及びマルトース及びガラクトースの利用の原因となる酵素のプロモータ領域がある。酵母の発現に好適に用いられるベクターとプロモータは欧州特許第73657号に記載されている。また酵母エンハンサーも酵母プロモータと共に好適に用いられる。

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからの抗体転写は、例えば、ポリオーマウィルス、鶏痘ウィルス、アデノウィルス (例えばアデノウィルス2)、ウシ乳頭腫ウィルス、トリ肉腫ウィルス、サイトメガロウィルス、レトロウィルス、B型肝炎ウィルス及び最も好ましくはサルウィルス40 (SV40) のようなウィルスのゲノムから得られるプロモータ、異種性哺乳動物プロモータ、例えばアクチンプロモータ又は免疫グロブリンプロモータ、熱衝撃プロモータ、によって、このようなプロモータが宿主細胞系に適合し、調節される。

SV40ウィルスの初期及び後期プロモータは、SV40ウィルスの複製起点をさらに含むSV40制限フラグメントとして簡便に得られる。ヒトサイトメガロウィルスの最初期プロモータは、HindIII制限フラグメントとして簡便に得られる。ベクターとしてウシ乳頭腫ウィルスを用いて哺乳動物宿主でDNAを発現する系が、米国特許第4419446号に開示されている。この系の修飾は米国特許第4601978号に開示されている。また、ヒトβインターフェロンcDNAは単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼプロモータの調節下で発現している。また、ラウス肉腫ウィルスの長い末端反復配列もプロモータとして使用することができる。

(v) エンハンサーエレメント成分

より高等の真核生物による本発明の抗体をコードしているDNAの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって増強され得る。哺乳動物の遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が知られている (グロビン、エラスターゼ

アルブミン、 α -フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウィルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製起点の後期側のSV40エンハンサー(bp100-270)、サイトメガロウィルス初期プロモータエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウィルスエンハンサーが含まれる。真核生物のプロモータの活性化のための増強要素については、Yaniv, Nature, 297:17-18 (1982) もまた参照のこと。エンハンサーは、抗体コード配列の5'又は3'位でベクター中にスプライスされ得るが、好ましくはプロモータから5'位に位置している。

(v i) 転写終止成分

真核生物宿主細胞(酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト又は他の多細胞生物由来の有核細胞)に用いられる発現ベクターは、また転写の終止及びmRNAの安定化に必要な配列を含む。このような配列は、真核生物又はウィルスのDNA又はcDNAの5'、時には3'の非翻訳領域から一般に取得できる。これらの領域は、抗体をコードしているmRNAの非翻訳部分にポリアデニル化フラグメントとして転写されるヌクレオチドセグメントを含む。ある有用な転写終止成分は、ウシ成長ホルモンのポリアデニル化部位である。国際公開第94/11026号及びここで開示されている発現ベクターを参照。

(v i i) 宿主細胞の選択と形質転換

ここでのベクター中でのクローニング又はDNAの発現に適した宿主細胞は、前掲の原核生物、酵母、又は高等真核細胞である。この目的に対して好適な原核生物は、グラム陰性またはグラム陽性生物等の真性細菌、例えば、エシェリチア等の腸内細菌科、例えば大腸菌、エンテロバクター、エルウィニア、クレブシエラ、プロテウス、サルモネラ、例えばサルモネラ・チフィウム、セラチア属、例えばセラチア・マルセスキャンス、及びシゲラ、並びにバシラス、例えばB. サチリス及びB. リチエニホルミス(例えば1989年4月12日公開のDD266710に開示されたB. リチエニホルミス41P)、シュードモナス、例えばP. エールギノーサ、及びストレプトマイセスを含む。1つの好ましい大腸菌クローニング宿主は、大腸菌294(ATCC 31,443)であるが、大腸菌B、大腸菌X1776(ATCC 31,537)、及び大腸菌W3110(ATCC 27,325)も適している。こ

れらの

例は、限定的でなく、例示的である。

原核生物に加えて、糸状菌や酵母のような真核性微生物が抗体コードベクターの好適なクローニング又は発現宿主である。一般のパン酵母であるサッカロミセス・セレビシエは下等真核宿主微生物の中で最もよく利用される。しかし、多くの他の属、種、及び株も一般に利用でき、ここで有用であり、例えば、シゾサッカロミセス・ポンベ；クルイベロミセス宿主、例えばK. ラクチス、K. フラジリス (ATCC 12, 424)、K. ブルガリクス (ATCC 16, 045)、K. ビッケラミー (ATCC 24, 178)、K. ワルティー (ATCC 56, 500)、K. ドロソフィラルム (ATCC 36, 906)、K. サーマートレランス及びK. マルキシアナス：ヤロービア (欧州特許第402226号)；ピチア・パストリス (欧州特許第183070号)；カンジダ；トリコデルマ・リーシア (欧州特許第号244234号)；ニューロスポラ・クラッサ；シュバニオマイセス、例えばシュバニオマイセス・オクシデンタリス；及び例えばニューロスポラ、ペニシリウム、トリポクラジウムのような糸状菌、及びアスペルギルス宿主、例えばA. ニジュランス及びA. ニガー等である。

グリコシル化抗体の発現に適した宿主細胞は、多細胞生物から由来のものである。第1に、脊椎動物又は無脊椎動物培養のいずれにおいても、任意の高等真核生物細胞培養が実行可能である。非脊椎動物細胞の例には植物及び昆虫細胞が含まれる、Luckowら、Bio/Technology 6, 47-55 (1988)；Millerら、Genetic Engineering, Setlowら編, Vol. 8, pp. 277-279 (Plenam 1986年出版)；Msedaら、Nature 315, 592-594 (1985)。多くのバキュロウイルス株及び変異体及びスポドプテラ・フルジペルダ (毛虫)、アエデス・エジプティ (蚊)、アエデス・アルボピクタス (蚊)、ドロソフィラ・メラノガスター (ミバエ)、及びボンビクス・モリ (Bombyxmori) のような宿主由来の対応する許容される昆虫宿主細胞が同定されている。特に関心のある細胞系は昆虫細胞系sf9である。種々のトランスフェクション用のウィルス株が公に入手でき、例えばオートグラファ・カルフォルニカ (Autographa Californica) NPVのL-1変異株、ボンビクス・モリNPVのBm-5株が挙げられ、このようなウィルスは、本発明に係るウィルスとして、特に、スポドプ

テラ・フルギペルダ細胞のトランスフェクションのために使用してもよい。綿、トウモロコシ、ジャガイモ、大豆、ペチュニア、トマト及びタバコの植

物細胞培養も宿主として使用できる。

しかし、最大の関心は脊椎動物細胞にあり、培養(組織培養)した脊椎動物細胞の増殖がルーチン作業となった。Tissue Culture, Academic Press, Kruse及びPatterson編(1973)を参照。有用な哺乳動物宿主細胞の例は、SV40(COS-7, ATCC CRL 1651)で形質転換させたサル腎CV1細胞株；ヒト胚芽腎細胞株(293又は懸濁培養で生長するようにサブクローン化された293細胞, Grahamら, J. Gen. Virol., 36:59(1977))；ベビーハムスター腎細胞(BHK, ATCC CCL10)；チャイニーズハムスター卵巢細胞／-DHFR(CH0, Urlaubら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216(1980))；マウスセルトリ細胞(TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251(1980))；サル腎細胞(CV1 ATCC CCL70)；アフリカミドリザル腎細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587)；ヒト頸管腫瘍細胞(HELA, ATCC CCL2)；イヌ腎細胞(MDCK, ATCC CCL34)；バッファローラット腎細胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442)；ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL 75)；ヒト肝細胞(Hep G2, HB 8065)；マウス乳房腫瘍細胞(MMT 060562, ATCC CCL51)；TRI細胞(Matherら, Annals N. Y. Acad. Sci., 383:44-68(1982))；MRC 5細胞；FS 4細胞；及びヒト肝癌細胞(Hep G2)である。

宿主細胞は、抗体生産のために前掲の本発明の発現又はクローニングベクターで形質転換され、プロモーターを誘発し、形質転換体を選出し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適切に修正した通常の栄養培地で培養される。

(v i i i) 宿主細胞の培養

この発明の抗体変異体を製造するのに用いる宿主細胞は、様々な培地中で培養し得る。HamのF10(シグマ)、最小必須培地(MEM、シグマ)、RPMI-1640(シグマ)、及びダルベッコの改変イーグル培地(DMEM、シグマ)等の商業的に入手し得る培地が、該宿主細胞を培養するのに適している。また、Hamら, Meth. Enzymol. 58:44(1979)、Barnesら, Anal. Biochem. 102:255(1980)；米国特許第4767704号、第4657866号、第4927762号；第4

560655号又は第5122469号；国際特許第87/00195号又は再発行米国特許第30985号に記載されたいずれの培地も、該宿主細胞用の培地

として使用し得る。これらの培地のいずれも、必要に応じて、ホルモンおよび／または他の成長因子（例えばインスリン、トランスフェリン又は上皮増殖因子）、塩（例えばX-クロリドで、Xはナトリウム、カルシウム、マグネシウム；リン酸塩）、緩衝液（例えばHEPES）、ヌクレオシド（例えばアデノシンおよびチミジン）、抗生物質（例えばゲンタマイシン（登録商標）剤）、微量元素（最終濃度がマイクロモルの範囲で通常存在する無機化合物と定義される）、およびグルコースまたは等価なエネルギー源を補い得る。いずれの他の必要な添加物も、当業者に知られているであろう適当な濃度で含めてもよい。温度、pH等の培養条件は、発現に選択された宿主細胞について以前に用いられた条件であり、当業者には明らかであろう。

（ix）抗体の精製

組換え技術を使用する場合、抗体変異体は、細胞膜周辺腔において細胞内に生産することができ、又は培地に直接分泌させることができる。抗体変異体が細胞内に生産されるときは、第一工程として、粒状細片を、例えば遠心分離又は限外濾過により、宿主細胞であれ溶解細胞であれ除去する。Carterら、*Bio/Technology* 10:163-167 (1992) には、大腸菌の細胞膜周辺腔に分泌される抗体を単離する手順が記載されている。簡単には、細胞ペーストを、酢酸ナトリウム（pH 3.5）、EDTA、及びフェニルメチルスルホニルフロリド（PMSF）の存在下で、30分以上かけて溶かす。細胞屑は遠心分離により除去可能である。抗体変異体が培地に分泌される場合は、そのような発現系からの上清を、商業的に入手可能なタンパク質濃縮フィルター、例えばアミコン又はミリポアペリコン限外濾過ユニットを使用して一般に最初に濃縮される。PMSFのようなプロテアーゼインヒビターを、タンパク分解を阻害するために先の工程の何れかで含めてもよく、また抗生物質を外來性汚染物の成長を防ぐために含めてもよい。

細胞から調製された抗体組成物は、例えばヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動法、透析、及びアフィニティークロマトグラフィーを使用

して精製することができ、アフィニティークロマトグラフィーが好適な精製法である。アフィニティリガンドとしてのプロテインAの適合性は、抗体変異体中に存在する任意の免疫グロブリンFcドメインの種及びアイソタイプに依存する。

プロテインAはヒト $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、又は $\gamma 4$ 重鎖に基づく抗体を精製するために使用することができる(Lindmarkら, J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983))。プロテインGが全てのマウスのアイソタイプ及びヒト $\gamma 3$ に対して推奨される(Gussら, EMBO J. 5:1567-1575 (1986))。アフィニティリガンドが結合されるマトリックスは最も頻繁にはアガロースであるが、他のマトリックスも利用することができる。調製穴あきガラスやポリ(スチレンジビニル)ベンゼンのように機械的に安定なマトリックスを使用すれば、アガロースの場合よりも速い流速と短い処理時間が可能になる。抗体がCH3ドメインを含む場合は、ベイカーボンド(Bakerbond) ABXTM樹脂(J. T. Baker, ニュージャージー州フィリップスバーグ)が精製に有用である。イオン交換カラムによる分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカによるクロマトグラフィー、ヘパリンセファロース(SEPHAROSE™)によるクロマトグラフィー、陰イオン又は陽イオン交換樹脂(ポリアスパラギン酸カラムなど)によるクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE及び硫酸アンモニウム沈殿のような他のタンパク質精製技術も、回収しようとする抗体によっては利用できる。

予備の精製工程に続いて、関心ある抗体変異体と汚染物質を含有する混合物を、約2.5-4.5のpHで溶離用バッファーを使用し、好ましくは低い塩分濃度(例えば、約0-0.25Mの塩)で低pH疎水性相互作用クロマトグラフィーにかけてもよい。

C. 製剤の調製

ポリペプチド又は抗体に治療用調製物は、当該技術において典型的に使用されている任意の「製薬的に許容可能な」キャリア、賦形剤又は安定剤(全て賦形剤と称される)と、所望の精製度を有するポリペプチドとを混合することにより、凍結乾燥された調製物又は水性溶液として保管されるように調製される。例え

ば、緩衝剤、安定剤、防腐剤、等張剤(isotonifiers)、非イオン性の洗浄剤、酸化防止剤及び他の様々な添加剤である(Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, A. Osol, Ed., (1980))。このような添加剤は、受容者に対して、使用される用量及び濃度で毒性のないものでなければならない。

緩衝剤は、生理学的条件に近い範囲内にpHを保持する助けをする。それらは

好ましくは約2mM～約50mMの範囲の濃度で存在している。本発明において適切に使用される緩衝剤には、有機酸と無機酸の両方、及びそれらの塩類、例えばクエン酸バッファー(例えば、クエン酸-ナトリウム-クエン酸二ナトリウムの混合物、クエン酸-クエン酸三ナトリウムの混合物、クエン酸-クエン酸-ナトリウムの混合物)、コハク酸バッファー(例えば、コハク酸-コハク酸-ナトリウムの混合物、コハク酸-水酸化ナトリウムの混合物、コハク酸-コハク酸二ナトリウムの混合物等)、酒石酸バッファー(例えば、酒石酸-酒石酸ナトリウムの混合物、酒石酸-酒石酸カリウムの混合物、酒石酸-水酸化ナトリウムの混合物等)、フマル酸バッファー(例えば、フマル酸-フマル酸-ナトリウムの混合物等)、フマル酸バッファー(例えば、フマル酸-フマル酸-ナトリウムの混合物、フマル酸-フマル酸二ナトリウムの混合物、フマル酸-ナトリウム-フマル酸二ナトリウムの混合物等)、グルコン酸バッファー(例えば、グルコン酸-グルコン酸ナトリウムの混合物、グルコン酸-水酸化ナトリウムの混合物、グルコン酸-グルコン酸カリウムの混合物等)、シュウ酸バッファー(シュウ酸-シュウ酸ナトリウムの混合物、シュウ酸-水酸化ナトリウムの混合物、シュウ酸-シュウ酸カリウムの混合物等)、乳酸バッファー(例えば、乳酸-乳酸ナトリウムの混合物、乳酸-水酸化ナトリウムの混合物、乳酸-乳酸カリウムの混合物等)及び酢酸バッファー(例えば、酢酸-酢酸ナトリウムの混合物、酢酸-水酸化ナトリウムの混合物等)が含まれる。さらに、リン酸バッファー、ヒスチジンバッファー及びトリメチルアミン塩、例えばTrisも挙げられる。

防腐剤は微生物の成長を妨げるために、0.2%-1%(w/v)の範囲の量で添加される。本発明における使用において好適な防腐剤には、フェノール、ベン

ジルアルコール、メタ-クレゾール、メチルパラベン、プロピルパラベン、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド、ベンザルコニウムハロゲン化物(例えば塩化物、臭化物、ヨウ化物)、塩化ヘキサメソニウム(hexamethonium)、アルキルパラベン類、例えばメチル又はプロピルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール及び3-ペンタノールが含まれる。

時として「安定剤」として既知の等張剤は、本発明の液体組成物を、確実に等浸透圧とするために存在し、多価糖アルコール、好ましくは三価(trihydric)又は

高級糖アルコール、例えばグリセリン、エリトリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール及びマンニトールが含まれる。多価アルコールは、他の成分の量と比較して、0.1重量%~25重量%、好ましくは1重量%~5重量%の量で存在可能である。

安定剤は、広くは、増量剤から治療用剤を安定化させる添加剤まで広範囲に機能する賦形剤の範疇に入るものか、容器壁への付着又は変性防止の補助をするものを称する。典型的な安定剤は、多価糖アルコール(前掲にて列挙)；アミノ酸、例えばアルギニン、リシン、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アラニン、オルニチン、L-ロイシン、2-フェニルアラニン、グルタミン酸、スレオニン等、有機糖類又は糖アルコール類、例えばラクトース、トレハロース、スタキオース、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、リビトール、ミオイニシトール(myoinisitol)、ガラクトクトール、グリセロール等であり、シクリトール、例えばイノシトール；ポリエチレングリコール；アミノ酸ポリマー；硫黄含有還元剤、例えば尿素、グルタチオン、チオクト酸、チオグリコール酸ナトリウム、チオグリセロール、 α -モノチオグリセロール及びチオ硫酸ナトリウム；低分子量のポリペプチド(すなわち<10残基)；タンパク質、例えばヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリン；親水性(hydrophylic)ポリマー、例えばポリビニルピロリドン単糖類、例えばキシロース、マンノース、フラクトース、グルコース；二糖類、例えばラクトース、マルトース、スクロース及び三糖類、例えばラフィノース；多糖類、例えばデキストリン

も含まれる。安定剤は活性タンパク質の重量部毎に0.1～1000重量部の範囲で存在する。

非イオン性の界面活性剤又は洗浄剤(「湿潤剤」としても知られている)は、治療剤を安定化、並びに振動誘発性凝集から治療用タンパク質の保護を補助するために存在し、またタンパク質の変性を引き起こすことなく、表面応力の剪断に調製物をさらすことができる。好適な非イオン性界面活性剤には、ポリソルベート(20、80等)、ポロキサマー(184、188等)、プルロニック®ポリオール、ポリオキシエチレンソルビタンモノエーテル(トウィーン(Tween®)-20、トウィーン-80等)が含まれる。非イオン性界面活性剤は約0.05mg/ml～10mg/ml、好ましくは約0.07mg/ml～約0.2mg/mlの範囲で存在

在する。

付加的な種々の賦形剤には、増量剤(例えばデンプン)、キレート剤(例えばEDTA)、酸化防止剤(例えばアスコルビン酸、メチオニン、ビタミンE)及び共溶媒が含まれる。

ここで、調製物は、処置において特に必要な一又は複数の活性化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を有するものを含有し得る。例えば、免疫抑制剤をさらに提供することが望まれている。このような分子は、好適には、意図した目的に有効な量で組合せて存在する。

また活性成分は、コロイド状薬剤デリバリーシステム(例えば、リポソーム、アルブミンマイクロフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル)、又はマクロエマルジョンにおいて、例えばコアセルベーション技術又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えばヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセルに捕捉されている。このような技術はRemington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, A. Osai, Ed., (1980)に開示されている。

インビボ投与用に使われる調製物は滅菌されなくてはならない。このことは、例えば滅菌フィルター膜を通すことで容易に達成される。

徐放性調製物を調製してもよい。徐放性調製物の適切な例には、抗体変異体質を含む固体疎水性重合体の半透性マトリックスが含まれ、マトリックスはフィルム状又はマイクロカプセル状等の成型物品の形態である。徐放性マトリックスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル（例えばポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリレート）、又はポリ（ビニルアルコール）、ポリ乳酸（米国特許第3773919号）、L-グルタミン酸とL-グルタミン酸エチルのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、例えばLUPRON DEPOT™（乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドからなる注入可能なミクロスフェア）、及びポリ-D-(-)-3-ヒドロキシ酪酸が含まれる。エチレン-酢酸ビニルや乳酸-グリコール酸等のポリマーは100日以上分子を放出できるが、特定のヒドロゲルはより短い時間タンパク質を放出する。カプセル化抗体は、長時間体内に残存すると、37℃で水分に曝されることで、変性又は凝集し、生物

学的活性の喪失や免疫原生の変化のおそれがある。かかるメカニズムによって安定性を得るための合理的な処置が考えられる。例えば、凝集機構がチオージスルフィド交換による分子間S-S結合であることが分かったら、スルフヒドリル残基を変更し、酸性溶液から凍結乾燥し、水分量を調整し、適当な添加物を使用し、特定の重合体マトリックス組成物を開発することで安定性を達成することができる。

特定の疾患又は病状の処置に有効な治療用ポリペプチド、抗体又はそれらのフラグメントの量は、疾患又は病状の種類に依存し、通常の臨床技術により決定される。可能であるならば、先ずインビボ、ついでヒトでテストする前の有用な動物モデルシステムにおける本発明の製薬用組成物用量反応曲線を決定することが望ましい。しかし、当該分野における一般知識に基づけば、知覚ニューロンの生存を促進するのに有効な製薬用組成物は、約5～20 ng/ml、好ましくは約10～20 ng/mlの濃度の局所用治療剤として提供される。本発明の付加的な特定の実施態様においては、網膜ニューロンの成長及び生存を促進するのに有効な製薬用組成物は、約10 ng/ml～100 ng/mlの濃度の局所用治療

剤として提供される。

好ましい実施態様においては、治療用ポリペプチド、抗体又はそれらのフラグメントは、皮下注射により投与される。各用量は、体重1 kg当り約0.5 μ g～約50 μ g、好ましくは体重1 kg当り約3 μ g～約30 μ gの範囲である。皮下投与の投与スケジュールは、病気の種類、病気の程度、及び患者の治療剤に対する敏感度を含む臨床要因の数に応じて1週間から1日に1度のように変えることができる。

D. 抗体変異体の非治療的用途

本発明の抗体変異体は親和精製剤として使用することができる。この目的において、抗体を固相、例えばセファデックス (Sephadex) 樹脂又は濾紙に、当該技術においてよく知られた方法を使用して固定する。固定化抗体変異体を、精製される抗原を含有するサンプルと接触させ、支持体を適切な溶媒で洗浄することにより、精製され、固定化抗体変異体の結合した抗原を除き、試料内の全ての物質が実質的に除去される。最後に、支持体を他の適切な溶媒、例えばpH 5.0 グリ

シンバッファーで洗浄し、抗体変異体から抗原を放出させる。

変異体抗体は、診断アッセイ、例えば特定の細胞における興味ある抗原の発現の検出においても有用である。

診断用途において、抗体変異体は典型的には検出可能部分で標識される。多くの標識が利用でき、一般的に次のカテゴリーに分類することができる：

(a) 放射性同位元素、例えば³⁶S、¹⁴C、¹²⁵I、³H及び¹³¹I。抗体変異体はCurrent Protocol in Immunology, vol1-2, Coligenら編, Wiley-Interscience, New York, Pubs. (1991)に記載されている技術を使用して放射性同位元素で標識され、シンチレーション計測を使用して測定することができる。

(b) 蛍光標識、例えば希土類キレート (ユーロピウムキレート) 又はフルオレイセン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、リサミン (Lissamine)、フィコエリトリン及びテキサス・レッド (Texas Red) が利用される。蛍光ラベルは、上掲のCurrent Protocol in Immunologyに開示されている技術を使用し、抗体変異体に抱合される。蛍光は蛍光計を使用して定量することができる。

(c)種々の酵素-基質ラベルが利用でき、米国特許第4275149号においてはこれらのいくつかが再考されている。酵素は一般的に、発色性基質の化学的变化を触媒し、種々の技術を用いて測定することができる。例えば、酵素は基質の色調変化を触媒し、これは分光光度的に測定することができる。また、酵素は基質の蛍光又は化学ルミネセンスを変化させることもできる。蛍光の変化を定量する技術は前掲している。化学ルミネセンス基質は化学反応により電氣的に励起し、次に測定可能な(例えば化学ルミネセンス計)光を発するか、又は蛍光アクセプターにエネルギーを付与する。酵素ラベルの例には、ルシフェラーゼ(例えば蛍のルシフェラーゼと細菌のルシフェラーゼ; 米国特許第4737456号)、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、マラートデヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ、ペルオキシダーゼ、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRPO)、アルカリ性ホスファターゼ、 β ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リソチーム、糖類オキシダーゼ(例えばグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース-6-ホスファート-デヒドロゲナーゼ)、複素環オキシダーゼ(例えばウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ)、ラクトペルオキシダーゼ、マイクロペ

ルオキシダーゼ等が含まれる。

酵素-基質組合せ物の例には、例えば：

(i) 基質としてのヒドロゲンペルオキシダーゼを西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRPO)、ここでヒドロゲンペルオキシダーゼは染料先駆物質を酸化する(例えば、オルトフェニレンジアミン(OPD)又は3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン-ヒドロクロリド(TMB))；

(i i) 発色性基質としてのp-ニトロフェニルホスファートとアルカリ性ホスファターゼ(AP)；及び

(i i i) β -D-ガラクトシダーゼと発色性基質(例えばp-ニトロフェニル- β -D-ガラクトシダーゼ)又は蛍光性基質-4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトシダーゼ、が含まれる。

多くの他の酵素-基質組合せ物が当業者により利用される。これらの一般的再考として、米国特許第4275149号及び同4318980号を参照のこと。

時折、ラベルは抗体変異体と間接的に抱合される。当業者であれば、これを達成するための種々の技術を知っているであろう。例えば、抗体変異体はビオチン、と抱合可能であり、また前掲のラベルの3つの広義のカテゴリの任意のものはアビジンと結合可能であり、またその逆もある。ビオチンはアビジンに選択的に結合し、よってこのような間接的な方法で、ラベルと抗体変異体は抱合可能である。別に、抗体変異体とラベルとの間接的抱合を達成させるには、抗体変異体を少量のハプテン(例えばジグロキシン(digloxin))と抱合させ、前掲の異なる種類のラベルの一つと抗-ハプテン抗体変異体(例えば、抗-ジグロキシン抗体)を抱合させる。このようにして、ラベルと抗体変異体との間接的抱合が達成される。

本発明の他の好ましい実施態様においては、抗体変異体をラベルする必要はなく、よって、その存在は抗体変異体に結合しているラベル化抗体を使用して検出され得る。

本発明の抗体は、任意の既知のアッセイ法、例えば競合結合アッセイ、直接及び間接サンドイッチアッセイ、及び免疫沈降アッセイに使用してもよい。Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147-158 (CRC Press, Inc.

1987)。

競合結合アッセイは、有限量の抗体変異体との結合における、テスト用サンプルに対して競合する標識された標準体の能力による。テスト用サンプル中の抗原の量は、抗体が結合する標準体の量に対して逆比例する。結合する標準体の量の測定を容易にするため、一般的に抗体は競合の前後に不溶化される。結果として、抗体に結合する標準体及びテスト用サンプルは、便宜上、結合しないで残存する標準体及びサンプルから分離する。

サンドイッチアッセイでは、検出される互いに異なる免疫原部分、又はエピトープ、又はタンパク質に結合可能な2つの抗体が使用される。サンドイッチアッセイにおいて、分析されるテスト用サンプルは、固体支持体に固定化された第1の抗体に結合し、その後、第2の抗体がテスト用サンプルに結合し、よって不溶

性の3部位複合体が形成される。例えば、米国特許第4376110号を参照。第2の抗体は検出可能な部分で、それ自身がラベルされてもよく(直接サンドイッチアッセイ)、又は検出可能な部分でラベルされた抗免疫グロブリン抗体を使用して測定してもよい(間接サンドイッチアッセイ)。例えば、一方の種類のサンドイッチアッセイはELISAアッセイであり、この場合、検出可能な部分は酵素である。

免疫組織化学において、腫瘍サンプルは新鮮なものであるか凍結されていてもよく、パラフィンに埋設されていてもよく、防腐剤、例えばホルマリンで固定されていてもよい。

また抗体はin vivo診断アッセイに使用してもよい。一般的に抗体変異体は、腫瘍は免疫シンチグラフィーを使用して局在化されるように放射性ヌクレオチド(例えば、 ^{111}In 、 ^{89}Tc 、 ^{14}C 、 ^{131}I 、 ^3H 、 ^{32}P 又は ^{35}S)で標識される。

E. 診断用キット

簡便な方法として、本発明のポリペプチド又は抗体はキット、すなわち診断アッセイを実施するための使用説明書と、予め定められた量の試薬を組合せて包装したものを提供する。抗体変異体は酵素でラベルされている場合は、キットは基質と酵素に必要な補助因子を含有する(例えば、検出可能な発色団又は蛍光団を提供する基質先駆物質)。加えて、他の添加剤、例えば安定剤、バッファー(例えば

ブロックバッファー又は溶菌バッファー)等も含まれる。種々の試薬の相対量は広範囲で変えることができ、アッセイの感度を実質的に最適にするような試薬溶液中の濃度が提供される。特に、試薬は、通常は凍結乾燥され、溶解時に適切な濃度を有する試薬溶液を提供する賦形剤を含む乾燥パウダーとして提供される。

F. ポリペプチド又は抗体のインビボにおける用途

本発明のポリペプチド又は抗体は哺乳動物を治療するための使用を意図している。一つの実施態様において、抗体は、例えば臨床前データを得るために、非ヒト哺乳動物に投与される。治療される例示的な非ヒト哺乳動物には、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、齧歯動物及び臨床前実験が行われる他の哺乳動物が含まれる。

このような哺乳動物は、抗体で治療される病気用の動物モデルとして確立されているか、又は関心ある抗体の毒性を調査するために使用される。これら各実施態様において、用量エスカレーション研究は哺乳動物において行われ得る。

抗体又はポリペプチドは、非経口的、皮下、腹膜内、肺内、及び鼻孔内、所望するならば局所的免疫抑制処置、病巣内投与を含む、任意の適切な手段により投与される。非経口的注入には、筋内、静脈、動脈、腹膜又は皮下投与が含まれる。加えて、抗体変異体は、特に抗体変異体の用量を減らして、パルス注入により適切に投与されてもよい。好ましくは、注射、より好ましくは、投与が短期であるか長期であるかに依存して、静脈又は皮下注射により投与される。

病気を予防又は治療するために、抗体又はポリペプチドの適切な用量は、抗体変異体が予防又は治療目的、先の治療用のいずれのために投与されても、治療される病気の種類、もちろん病気の程度、患者の病歴及び抗体変異体の反応性、及び教育研究病院医の判断に依存する。抗ヒトIgE抗体は1回又はそれ以上の連続した処置において、適切に患者に投与される。

例えば、一又は複数回に分けた投与、又は連続注入にかかわらず、病気の種類及び程度に応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}\sim 150\text{mg}/\text{kg}$ (例えば、 $0.1\sim 20\text{mg}/\text{kg}$)の抗体又はポリペプチドが、患者に投与される最初の候補用量である。典型的な1日の用量は、前掲の要因に依存して、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}\sim 100\text{mg}/\text{kg}$ 又はそれ以上の範囲である。数日又はそれ以上繰り返し投与する場合は、病状に応じて、病気の徴候が所望の程度に抑制されるまで治療を続ける。しかし、

他の用量摂生が必要である。この治療の前進は、従来の技術及びアッセイにより容易にモニターされる。抗LFA-1又は抗ICAM-1抗体の例示的な用量摂生については、国際公開第94/04188号に開示されている。

抗体変異体組成物は、良好な医術と整合的方法において調製され、適量にされ、投与される。このような関係において考慮すべき要因には、特に治療される疾患、中でも治療される哺乳動物、個々の患者の臨床的状态、疾患の原因、薬剤を付与する部位、投与方法、投与スケジュール、及び医師に公知の他の要因が含ま

れる。投与される抗体変異体の「治療に有効な量」は、このような考えにより決定され、病気又は疾患の予防、改善又は治療に必要な最小量とされるであろう。抗体変異は必須ではないが、場合によっては、現在問題の疾患の予防又は治療に使用される一又は複数の薬剤と共に調製される。このような他の薬剤の有効量は、調製物中に存在する抗ヒトIgEの量、疾患又は処置の種類、及び前掲した他の要因に依存する。これらは、一般的に、前掲における使用と同様の用量及び投与経路、又はこれまで使用されていた用量の約1～99%で使用される。

G. 製造品

本発明の他の好ましい実施態様において、前掲の疾患の治療に有用な物質を含む製造品が提供される。製造品には容器とラベルも含まれる。適切な容器には、例えばボトル、バイアル、シリンジ及び試験管が含まれる。容器はガラス又はプラスチックのような様々な材料で形成することができる。容器は病状の治療に有効な活性剤を含む組成物を収容しており、滅菌した出入口を有している(例えば、容器は皮下注射針により貫通可能なストッパーを具備する静脈溶液用のバック又はバイアルであってよい)。組成物中の活性剤は抗体変異体である。容器上又は容器に伴うラベルには、組成物が選択された病状の治療に使用されることが示されている。製造品は、製薬的に許容可能なバッファー、例えばリン酸緩衝食塩水、リンガー液及びデキストロース溶液を収容する第2の容器をさらに具備する。さらに、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、および使用指示書を伴うパッケージ挿入物を含む、市販及び使用者の観点から望ましい他の材料を更に含んでもよい。

以下の実施例は発明を例証するものであって、限定するものではない。

実施例

実施例1

IgEに対するモノクローナル抗体の調製

IgEのFcεR1への結合をブロックする能力を持つ8つのモノクローナル抗体(MAE10-MAE17)を調製した。IgEに対するモノクローナル抗体は、単離した抗-IgE抗体(Genentech MAE1)上のアフィニティークロ

マトグラフィを用いてU266B1 (ATCC TIB 196) 細胞の上清から調製した。MAE12について、5匹の6週齢のBALB/c雌マウスを、それらの足蹠でリビス (Ribi's) アジュバント中の10 μ gの精製したIgEで免疫化した。最初の免疫化の1及び3週後に、同様の方法で注射を続けた。最後の注射から3日後に、単径部及び膝窩のリンパ腺を取り出してプールし、その組織をスチールガーゼを通すことにより単細胞懸濁物を作製した。細胞は、50%w/vのポリエチレングリコール4000を含有する高グルコース(DMEM)において4:1の比率でマウス骨髄腫P3X63-Ag8.653(ATCC CRL 1580)と融合させた。MEA14、MAE15及びMAE13については同様の方法で免疫化したが、MAE13のみは1回の注射当たり30 μ gのIgEを用い、IgEフラグメント315-347(Kabat)はプレフュージョンブースト(prefusion boost)でアッセイし: MAE10及びMAE11については、注射は100 μ gの2回投与及び50 μ gの最終ブーストで皮下で行い、融合には脾臓細胞を用いた。

融合細胞は、次いで、96ウェル組織培養プレートにおいて、各ウェル当たり 2×10^5 の密度でプレートした。24時間後にHAT選択性媒質(ヒポキサンチン/アミノプテリン/チミジン、Sigma, #H0262)を添加した。プレートした1440のウェルのうち、365がHAT選択後に成長細胞を含んでいた。

融合の15日後、上清を、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)を用いてヒトIgEに特異的な抗体の存在について試験した。ELISAは以下のように実施し、全てのインキュベーションは室温で行った。試験プレート(Nunc Immunoplate)を、50mM炭酸ナトリウム緩衝液、pH9.6中の1 μ g/ml

1のラット抗-マウスIgG(Boehringer Mannheim, #605-500)で2時間コートし、次いで、リン酸緩衝塩水中の0.5%のウシ血清アルブミンで30分間ブロックし、次いで、0.05%のTween20を含むPBS(PBST)で4回洗浄した。試験上清を添加し、2時間振とうしながらインキュベートし、次いで、PBSTで4回洗浄した。ヒトIgE(U266細胞から上記のように精製)を0.5 μ g/mlで添加し、次いで、振とうしながら1時間インキュベートし

た後、PBSTで4回洗浄した。ヤギ抗-ヒトIgE (Kirkegaard & Perry Labs, #14-10-04, 0.5mg/ml) と複合させたセイヨウワサビペルオキシダーゼを1:2500希釈で添加して1時間インキュベートし、次いでPBSTで4回洗浄した。10mgのo-フェニレンジアミンジヒドロクロライド (Sigma, #P8287) を含む溶液10 μ l/ウェル及び25mlリン酸クエン酸緩衝液、pH5.0、中の30%過酸化水素10 μ lを添加し、15分間インキュベートすることによりプレートを現像した。反応は、2.5M硫酸を100 μ l/ウェル添加することにより停止させた。データは、自動化ELISAプレートリーダーにおいて、490nmの吸収でプレートを読むことにより得た。MAE12については、365の上清を試験し、100がヒトIgEに特異的であった。他の抗体についてスクリーニングすると、IgE特異的な類似の配列が得られた。ここに記載したMAE17及びMAE14を除く全てのモノクローナル抗体はIgG1アイソタイプであり、MAE17はIgG2b、MAE14はIgG2aであった。

各IgE特異的抗体を、細胞ベース及びプレートアッセイにおいてさらに試験し、IgEのFc ϵ RIへの結合を阻害するようにIgEに結合し、FCEH-結合IgEには結合できない抗体を選択した。これらのアッセイの結果を、以下の表1及び表2に示す。

表 1

マウス抗Hu IgE mAbの特性の概要

mAb	免疫原	スケジュール/ 投与量 (g)	B-細胞源	アイソ タイプ	Fc RI-結合 IgE ¹ の結合	PBLヒス タミン放 出 ² (EC50)	Fc RI ³ ブロッキ ング量 (EC50)
MaE1	PS IgE	3 x 50	リンパ 腺	IgG1	0.05 g/ml	1 g/ml	0.3 g
MaE10	U266 IgE	2x100, 1x50	脾臓	IgG1	10g/mlで 結合しない	> 100 g/ml	2.5 g
MaE11	U266 IgE	2x100, 1x50	脾臓	IgG1	10g/mlで 結合しない	> 100 g/ml	0.6 g
MaE12	U266 IgE	3x30	リンパ 腺	IgG1	10g/mlで 結合しない	> 100 g/ml	0.8 g
MaE13	U266 IgE	3x30	リンパ 腺	IgG1	10g/mlで 結合しない	> 10 g/ml	0.6 g
MaE14	U266 IgE	5x50	リンパ 腺	IgG2a	10g/mlで 結合しない	> 100 g/ml	2.5 g
MaE15	U266 IgE	5x50	リンパ 腺	IgG1	10g/mlで 結合しない	> 100 g/ml	0.6 g
MaE16	rHIgE aa315-547	5x1	リンパ 腺	IgG1	10g/mlで 結合しない	> 100 g/ml	0.7 g
MaE17	rHIgE aa315-547	5x1	リンパ 腺	IgG2b	10g/mlで 結合しない	> 100 g/ml	>5.0 g

表 2

マウス抗Hu IgEの概要(続き)

mAb	U266BL 上の膜IgEへの結合 (EC50) ⁴	FceRII(CD23) IM9 上のIgEの結合(EC50) ⁵	FceRIIへの1 μ gの IgEの結合を阻害する量(EC50) ⁶	インビトロIgE合成の阻害 ⁷	IgE8 についての親和性定数(Kd)
MaE1	0.4 μ g/ml	0.05 μ g/ml	>100 μ g	(-)	5.4x10 ⁻⁸
MaE10	0.5g/ml	10 μ g/mlで結合しない	2.5 μ g	(-)	7x10 ⁻⁹
MaE11	0.15 μ g/ml	10 μ g/mlで結合しない	0.6 μ g	(+)	3x10 ⁻⁸
MaE12	> 10 μ g/ml	1 μ g/ml	5.0 μ g	(+)	4x10 ⁻⁷
MaE13	1 μ g/ml	10 μ g/mlで結合しない	0.7 μ g/ml	(++)	5x10 ⁻⁸
MaE14	6 μ g/ml	10 μ g/mlで結合しない	2.5 μ g/ml	(\pm)	1.4x10 ⁻⁸
MaE15	6 μ g/ml	10 μ g/mlで結合しない	0.6 μ g/ml	(\pm)	7x10 ⁻⁸
MaE16	10 μ g/ml	<0.05 μ g/ml	5 μ g	(+)	ND
MaE17	10 μ g/ml	10 μ g/mlで結合しない	5 μ g	(++)	ND

1. マウス抗-ヒトIgEモノクローナルの分析のためのFACSベースアッセイ。CHO3D10 (FcεRIアルファ+) 上のIgEGに結合するマウス抗-ヒトIgEモノクローナルのスクリーニング。

a. サンプル当たり5×10⁵細胞のCHO3D10細胞 (FcεRIアルファ鎖安定トランスフェクタント、Hakimiら, J. Biol. Chem. 25:22079) を、

100 μ lのFACS緩衝液 (0.1%BSA、PBS中の10mMアジ化ナトリウム、pH7.4) 中の10 μ g/mlのU266IgE標品 (ロット番号13

068-46) とともに4℃で30分間インキュベートした後、FACS緩衝液で1回洗浄した。結合するIgEの量は、IgE担持細胞細胞のアリコート $50\mu\text{g}/\text{ml}$ のポリクローナルFITC複合ウサギ抗ヒトIgG (Accurate Chem Co. AXL-475F, ロット番号16) とともに4℃で30分間インキュベートし、FACS緩衝液で3回洗浄して測定した。

b. IgE担持細胞を、 $100\mu\text{l}$ のマウス抗ヒトIgEハイブリドーマ上清(マウスIgG濃度は1から $20\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲) とともに、4℃で30分間インキュベートし、次いでFACS緩衝液で1回洗浄した。結合のポジティブコントロールとして $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のGenentechモノクローナル抗ヒトIgE (MaE1) を用いた。ネガティブコントロールとして $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のIgEを認識しないGenentechモノクローナル(MAD6P) を用いた。

c. CHO細胞上のヒトIgEへのモノクローナル結合を、細胞を $20\mu\text{g}/\text{ml}$ のFITC複合、アフィニティ精製したF(ab')₂ヤギ抗-マウスIgG (Organon Teknica, #10711-0081) とともに4℃で30分間インキュベートし、FACS緩衝液で3回洗浄することにより検出した。細胞に、 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ ヨウ化プロピジウム (Sigma, #P4170) を含む $400\mu\text{l}$ の緩衝液を添加して脂肪細胞を染色した。

d. 細胞を、Becton Dickinson FACSCANフローサイトメーターで分析した。前方光散乱及び90度側方散乱ゲートを、細胞の均一集団分析用に設定した。ヨウ化プロピジウムで染色した死亡細胞は分析から除外した。CHO3D10細胞上のIgEに結合しないハイブリドーマ上清を、さらなるスクリーニングの候補と考えた。

2. 末梢血液好塩基球からのヒスタミン放出。平常ドナーからヘパリン化血液を得て、変性タイロード緩衝液(25mM Tris, 150mM NaCl, 10mM CaCl₂, MgCl₂, 0.3mg/ml HSA, pH7.35) 中で1:4に希釈し、次いで、1nMヒトIgE (ND) とともに4℃で60分間インキュベートした。次に、細胞を、ポジティブコントロールとしてマウスモノクローナル抗-IgEAb ($10\text{mg}/\text{ml}$) ま

たはポリクローナル抗-ヒト抗血清のいずれかを含有するタイロード緩衝液に添

加し、37℃で30分間インキュベートした。細胞をペレット化し、上清中のヒスタミンをアセチル化して、ヒスタミン含有量をRIAキット (AMAC, Inc. Westbrook, Main) を用いて測定した。全ヒスタミンは、数回の凍結融解を施した細胞から測定した。

3. FcεRIアルファ鎖へのF i t c 複合 I g E 結合のブロック。I g E の結合に対する抗体の影響は、I g E ラベルしたF i t c を、0.1% BSA及び10mMアジ化ナトリウムを含むpH7.4のPBS中で、種々のMaE抗体と37℃で30分間プレインキュベートし、次いで複合体を 5×10^5 の3D10細胞と4℃で30分間インキュベートすることにより実験した。細胞は、次いで、3回洗浄し、475nMでの平均チャンネル蛍光を測定した。I g E のF c ε R I アルファ鎖への結合をブロックしないマウス抗ヒトI g E mAb (Ma e l) をコントロールとして用いた。

4. 膜 I g E 陽性B細胞U266へのマウス抗ヒトI g E 結合の分析。

a. U266B1細胞 (膜I g E+) を、15%ヘッド不活性ウシ胎児血清 (Hyclone, #A-1111-L)、ペニシリン、ストレプトマイシン (100単位/ml)、及びL-グルタミン (2mM) を付加した塩基性媒質中で培養した。

b. 細胞 (5×10^5 /アリコート) を、10、5、1、0.5及び0.1 μg/mlを含むマウス抗-ヒトI g Eモノクローナルを含む100 μlのFACS緩衝液中で、96ウェルの丸底マイクロタイタープレート中、氷上で30分間インキュベートし、FACS緩衝液で2回洗浄した。GenentechモノクローナルMAE1を、ポジティブコントロールとして用いた。

c. 細胞を、50 μg/ml (1:20ストック) FITC複合F(a b')₂アフィニティ精製ヤギ抗-マウスI g E (Organon Teknika, #1711-0084) を含む100 μlのFACS緩衝液中、氷上で30分間インキュベートし、FACS緩衝液で3回洗浄した。細胞を、ヨウ化プロピジウムを2 μg/mlで含有する400 μl FACS緩衝液に添加して死亡細胞を染色した。

5. FcεRII (CD23) + B細胞IM9へのFACSベースの結合アッセイ。

a. IM9ヒトB骨髄腫細胞(ATCC CCL159, Ann. N. Y. Acad. Sci. 190:221-234 (1972))を、10%の熱不活性化したウシ胎児血清、ペニシリン、ストレプトマイシン(100単位/ml)及びL-グルタミン(2mM)とともに、GIF塩基性媒質中に維持した。

b. 細胞(5×10^5 /アリコート)をU266 IgE標準を $2 \mu\text{g/ml}$ で含むFACS緩衝液 $100 \mu\text{l}$ 中、96ウェルマイクロタイタープレートにおいて4℃で30分間インキュベートし、FACS緩衝液で2回洗浄した。コントロールとして、細胞を緩衝液のみ、またはヒトIgG1 (Behring Diagnostics, cat. no. 400112, ロット番号801024) $2 \mu\text{g/ml}$ を含む緩衝液でインキュベートした。

c. 次いで、細胞を0.1から $10 \mu\text{g/ml}$ のマウス抗-ヒトIgEモノクローナルとともに、氷上で30分間インキュベートした。GenentechモノクローナルMAEIをポジティブコントロールとして用いた。

d. 細胞を、次いで、FITC複合F(ab')₂ヤギ抗マウスIgGを $50 \mu\text{g/ml}$ (Organon Teknika, #1711-0084)を含むFACS緩衝液 $100 \mu\text{l}$ 中、4℃で30分間インキュベートし、FACS緩衝液で3回洗浄した。

e. 次いで、細胞に、ヨウ化プロピジウムを $2 \mu\text{g/ml}$ で含む緩衝液 $400 \mu\text{l}$ を添加して死亡細胞を染色した。

f. 細胞を、Becton Dickinson FACSCANフローサイトメーターで分析した。前方光散乱及び90度側方散乱ゲートを、細胞の均一集団分析用に設定した。ヨウ化プロピジウムで染色した死亡細胞は分析から除外した。FITC陽性細胞(IgE結合)を、FITCウサギ抗-ヒトIgEのみで染色した細胞に対して分析した。

g. 各実験におけるIM9細胞表面上のCD23のレベルを決定するためのポジティブコントロールとして、細胞のアリコートを $10 \mu\text{g/ml}$ のBecton DickinsonマウスモノクローナルLeu 20 (抗-CD23)で、4℃で30分間染色し、2回洗浄した。次いで、細胞をFITC複合F(ab')₂アフィニティ精製ヤギ抗-マウスIgG $50 \mu\text{g/ml}$ とともにインキュベートした。

6. 低親和性IgEレセプターへのFITC複合IgE結合をブロックする

抗体。

40 nMのFITCラベルしたIgEの、Bリンパ芽球細胞IM-9上に表現された低親和性IgEレセプター(CD23またはFcεRI)への結合を、FACSCANフローサイトメーターでのフローサイロメトリーで分析した。抗体のFITC IgE結合に対する影響は、FITC IgEを、マウス抗-ヒト抗体を0.1から10 μg/mlキメラとともに、0.1%BSA及び10 mMのアジ化ナトリウムを含むpH7.4のPBS中、37℃で30分間ブレインキュベートし、その複合体を5×10⁵細胞で、4℃で30分間インキュベートすることにより実験した。次いで、細胞を3回洗浄し、平均チャンネル蛍光を457 nmで測定した。

7. IgEインビトロアッセイプロトコール

- a. 末梢血液単核細胞を、平常ドナーから分離した。
- b. 細胞をPBSで強く洗浄して血小板をできる限り除去した。
- c. 単核細胞を数え、媒質中に1×10⁶細胞/mlで再懸濁した。媒質は、DMEMとペニシリン及びストレプトマイシン、15%ウマ血清、IL-2 (25 U/ml) 及びIL-4 (20 ng/ml) の混合物とした。
- d. 抗体を、0、5及び8日目に、適切な濃度で添加した。
- e. 培地を、24ウェルのFalcon組織培養プレートで14日間インキュベートした。
- f. 14日目に、上清を除去し、IgE特異的ELISAプロトコールによりIgE濃度をアッセイした。

8. ヒトIgEに対するマウスmAbの親和性定数(kd)を平衡結合スキャッチャード分析で決定した。

- a. IgE (ND及びPSアロタイプ) をクロラミンT法によってヨウ素化し、RIA緩衝液: PBS、0.5%ウシ血清アルブミン (Sigma, #A-7888)、0.05% Tween 20 (Sigma, #P-1379)、0.01% チメルソール (Sigma, #T-5125)、pH7.4中のPD10 sephadex G25カラム (Pharmacia, #17-0851-01) で、フリーの¹²⁵I Naから分離した。約78-95%のカラム後の計数は、50%トリクロロ酢酸で沈殿させ、ヨウ素化IgE製剤の特異的活性は、70%

の計数効率を仮定して1.6から13 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ の範囲であった。

b. 固定濃度(約 $5 \times 10^4 \text{ cpm}$)の ^{125}I を、12×75mmポリプロピレン試験管内の0.1ml RIA緩衝液中の最終容量が種々の濃度の非ラベルIgE(1から200nM)に添加した。0.1mlのRIA緩衝液中のマウス抗ヒトIgE mAb(最終濃度20mM)を添加して、最終アッセイ用容量0.2mlとした。

c. サンプルを、連続攪拌しながら25℃で16-18時間インキュベートした。

d. 結合した及びフリーの ^{125}I IgEを、RIA緩衝液中のCNBr活性化Sephrose 4B(Pharmacia, #17-0430-01)に結合したアフィニティ精製ヤギ抗マウスIgG(Boehringer Mannheim, #605-208)及びキャリアプロテインA Sepharose(Repligen, #IPA 300)の混合物0.3mlを添加することにより分離し、強く攪拌しながら25℃で1から2時間インキュベートした。次いでRIA緩衝液(1ml)を添加し、試験管を400×gで5分間遠心分離した。次いでサンプルを数えて全計数を決定した。上清を微小吸引ピペットで吸引し、サンプルを再計数し、フリーに対する結合した数を計算した。

e. NIHのP. Munsonによって書かれたリガンドプログラムに基づくフォートランプログラム(scanplot)を用いてスキャッチャード分析を実施した。スキャッチャードプロットは、全体としてRodbardタイプ回帰分析の関数として結合させた質量作用等式フィッティングを用いた。

実施例2

ヒト化MaE11の調製

序文:

以下の実施例は、ヒト化MaE11の種々の調製を記載し、残基は、部位指向性突然変異を介して修飾されて12の抗IgE MaE11変異体[F(ab)1-12]に達している。F(ab)12の残基は、1992年8月14日に出願されたPCT/US92/06860に記載した高能力の抗IgE抗体であるrhumaE25またはE25を生成するテンプレートとして用いた。

方法：

図1に示すマウス抗-ヒトIgE mAb MaE11を、pUC119ベースのプラスミド、pAK2 (Carterら, (1992), Proc. Natl. Aca. Sci. USA 89:4285) 中のヒトk-サブグループI軽鎖及びヒトサブグループIII重鎖 (VH-CH1) を含むデオキシウリジン含有テンプレートから、部位指向性突然変異 (Kunkel, T. A., (1985), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488) により修飾し、変異体F(ab)-1を得た。F(ab)2はF(ab)-1テンプレートから構築し、他の全てのヒト化F(ab)変異体は、F(ab)-2のテンプレートから構築した。プラスミドは、二本鎖及び一本鎖DNAの調製のために、E. coli株JM101中にトランスフォームした (Messing, J. (1979), Recomb. DNA Tech. Bul. 2:43; Ausubleら, Current Protocols in Molecular Biology, Unit1 (1997))。軽及び重鎖残基の両方を、ジデオキシヌクレオチド法を用いて完全に配列させた。軽及び重鎖をコードするDNAは、次いで、E. coliのF(ab)発現プラスミド、pAK19 (Carterら, (1992), Biotechnology 10:163) の誘導体中にサブクローンした。この誘導体は、F(ab')₂フラグメントで内部重鎖ジスルフィドを形成するヒンジシテイン (hingecysteine) を欠く。F(ab)フラグメントは、全長IgG抗体とは異なり、ほ乳類細胞培養技術ではなくE. coli発現を用いることができるので、かなり多数の変異体の分析を促進した。これら個々の変異体は、1993年3月4日に発行された出願W093/04173に記載されている。最適な変異体が決定されれば、それは続いて、全長ヒトIgG1をコードするプラスミドにサブクローンされる (以下参照)。

発現プラスミドは、E. coli株MM294 (Meselon, M及びR. Yuan (1968), Nature 217:1110) 中に形質転換され、単一のコロニーを、5mlの2YT媒質-カルベニシリン (100 µg/ml) 中、37℃で5-8時間成長させた。培地 (5ml) に、次いで100mlのAP5媒質-カルベニシリン (100 µg/ml) を添加し、500mlのシェーカーフラスコ中、37℃で16時間成長させた。培地を4,000 x gで遠心分離し、上清を除去した。1時間凍結させた後、ペレットを5mlの冷たい10mMのTris、1mMのEDTA及び50 µlの0.1Mベンズアミジン (Sigma, St. Louis) 中に再懸濁し

たが、後者は蛋白質分解を阻害するために添加した。氷上で1時間優しく攪拌した後、サンプルに10,000xgで15分間遠心分離した。上清にタンパク質A-Sepharose CL-4B (Pharmacia) カラム (0.5ml ベッド容量) を適用し、10ml の3M塩化カリウム/100mLのTris、pH8.0で洗浄し、100mM酢酸 (2.5ml)、pH2.8で1MのTris、pH8.0 (0.5ml) 中に溶離した。

F (a b) 緩衝液を、Centricon-30 (Amicon) を用いてPBS中に交換し、最終容量0.5mlに濃縮した。各F (a b) フラグメントのSDS-PAGEゲルを、精度を確認するために流出させた。F (a b) 濃度を、0.1%の1.0の ϵ_{280} を用いて決定した。この同じサンプルについて、消衰係数を、精製したF (a b)-2 及びA₂₈₀のアミノ酸分析からのタンパク質濃度を用いて決定した。

選択したF (a b) フラグメントは、液体クロマトグラフィ/マススペクトルによって直接分析し、それらの分子量を確認した。サンプルを、重点キャピラリー液体クロマトグラフィシステム (Henzel, W. J. ら (1990), Anal. Biochem. 187:228) に注入し、Sciex API 3マススペクトロメータで直接分析した。サンプルについて用いたものと同じ装置パラメータを用いるのに必要とされるヒト成長ホルモン (m. w. 22, 256.2) のより高く荷電した状態が、キャリブレーションのために使用された。

ヒト化MaE11の全長ヒトIgG1バージョンの一般化のために、重鎖及び軽鎖を、既に述べたpRKプラスミド (Gorman, C. M. ら, (1990), DNA Protein Eng. Tech. 2:3) に別々にサブクローンした。(望まれる配列変化に依存して) 適当な重鎖及び軽鎖プラスミドを、293 (Graham, F. L. ら (1977), J. Gen. Virol. 36:59) として知られるアデノウィルス形質転換したヒト胚腎臓細胞系に、高効率法 (Grahamら, 上記、及びGorman, C. M., Science 221:551) を用いたコトランスフェクトした。媒質を血清無しに変換し、5日まで毎日収穫した。抗体をプールした上清から、タンパク質A-Sepharose CL-4B (Pharmacia) を用いて精製した。溶離した抗体をG25ゲル濾過によりPBSに緩衝液交換し、Centriprep-30又はCentricon-100 (Millipore) を用いて限外濾過し、4℃で貯蔵した。抗体濃度は、全IgG-結合ELISAを用いて決定した。結果

を表4に記載する。

可溶性レセプターアッセイ：

96-ウェルのアッセイプレート (Nunc) を、コーティング緩衝液中 (50 mM の炭酸、重炭酸塩、pH 9.6) の0.05 ml のFcεRIα-鎖IgGキメラレセプターで、4-8℃で12時間コートした。ウェルを吸引し、250 μl のブロッキング緩衝液 (PBS、1% BSA、pH 7.2) を添加し、4℃で1時間インキュベートした。別のアッセイプレートにおいて、サンプル及び参照用マウスMaE11を、200~0.001 μg/mlまでアッセイ緩衝液 (0.5% BSA及び0.05% Tween 20、PBS、pH 7.2) での1:4希釈液で滴定し、10 ng/ml のビオチニル化IgE (0-Shannessy, D. J. ら (1984), Immunol. Let. 8:273) を等容量添加した後、プレートを25℃で2-3時間インキュベートした。FcεRI-コートしたウェルをPBS及び0.05%のTween 20 (Sigma) で3回洗浄し、サンプルウェルから50 μl を移して、攪拌しながら25℃で30分間インキュベートした。ストレプトアビジン-HRP (500 μg/ml、Sigma) の溶液、アッセイ緩衝液中の1:5000希釈液を50 μl /ウェルで添加した後、プレートを攪拌しながら15分間インキュベートし、上述のように洗浄した。50 μl /ウェルのミクロウエルペルオキシダーゼ基質 (Kirkgaard & Perry Laboratories) を添加し、30分間発色させた。等量の1NのHClを添加することにより反応を停止し、450 nmで吸収を測定した。ブロッキング抗体の濃度対パーセント阻害をプロットし、カレイダグラフ (Kaleidagraph) データ分析アプリケーション (Synergy Software) を使用して非線形の4パラメータのカーブフィッティングで、50%阻害の濃度を計算した。結果を表3に報告する。

FACSベースの結合アッセイ：

抗体がFITC-複合 (Goding, J. W. ら (1976), J. Immunol. Methods 13:215) IgEのCHO3D細胞 (Hakimi, J. ら (1990), J. Biol. Chem. 265:22079) 上に表現された高親和性FcεRIレセプターのα鎖に結合を阻害する能力を、

フローサイトメトリーで測定した。FITC-複合IgE (40 mM) を抗体 (0.

3-1. 0×10^{-6} M) とともに 37°C で 30 分間、FACS 緩衝液 (PBS、0.1% BSA、及び 10 mM アジ化ナトリウム、pH 7.4) 中でプレインキュベートした。複合体を、次いで、 5×10^5 の CHO CD10 細胞とともに 4°C で 30 分間インキュベートした。細胞を FACS 緩衝液で 3 回洗浄し、475 nm における平均チャンネル蛍光を FACSscan フローサイトメータ (Becton Dickinson) で測定した。MaE1、IgE の $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha$ 鎖への結合をブロックしないマウス抗-ヒト IgEmAb をポジティブコントロールとして用い、MOPC 21 (Cappel)、IgE を認識しないマウスモノクローナルをネガティブコントロールとして用いた。結果を表 3 に記載する。

抗体の IgE 担持 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ への結合：

ヒト IgE への抗体結合を、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ヒト IgE とともに、CHO CD10 細胞上に表現された $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ の α -サブユニットと 4°C で 30 分間結合させた。細胞を 3 回洗浄した後、濃度を変化させながら、マウス抗-ヒト IgEmAb の MaE1 または MaE11 またはヒト化 mAb 変異体 12 [F(ab)12] とともに 30 分間インキュベートした。MOPC 21 (マウス IgG1) をマウス mAb のコントロールとして用い、ヒト化 4D5 mAb (Carter ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992), ヒト IgG1) を F(ab)12 のコントロールとして用いた。マウス mAb の結合は FITC-複合 F(ab')₂ ヤギ抗-マウス IgE ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) で検出した。ヒト化 mAb 結合は FITC-複合 F(ab')₂ ヤギ抗-ヒト IgG ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) で検出したが、これらは、IgE との交差反応性を最小にするため、IgE カラムから精製したものである。結果を図 4 に記載する。

マウス及びヒト化 F(ab') のコンピュータグラフィクスモデル：

図 1 の F(ab) VL 及び VH ドメインの配列を用い、マウス MaE11 VL-VH ドメインのコンピュータグラフィクスモデルを構築した。このモデルは、引き続き、何れのフレームワーク残基を F(ab)-2 の生成をもたらすヒト化抗

体に組み込むべき化を決定するのに用いた。また、ヒト化変異体のモデルは、マウスのフレームワーク残基の正しい選択を正当化するために構築された。モデル

の構築は、Carterら(1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285;Eigenbrot, C. ら(1993), J. Mol Biol. 229:969に記載されたように実施した。

結果

ヒト化M a E 1 1 抗体の設計：

ヒト化抗体のこの実験は、ヒトのコンセンサス配列を用いた。これは、対象とするマウス I g に最も近いヒト配列を用いていた他のヒト化技術とは対照的である。Shearman, C. W. ら(1991), J. Immunol. 147:4366;Kettleborough, C. A. ら(1991), Protein Eng. 4:773;Tempest, P. R. ら(1991), Biotechnology 9:266;Co, M. S. ら(1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2869;Routledge, E. G. (1991), Eur. J. Immunol. 21:2717。このヒトコンセンサス配列は、Kabatら(1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5 ed., National Institute of Health, Bethesda, MDにおいて決定されたヒトVHサブグループ I I I 及びVL κ サブグループ I に基づくフレームワークからなる。F(a b)-1は、上記のKabatにより決定された6つのCDRを、ヒト I g G 1 フレームワークにグラフトすることにより生成した。全てのフレームワーク残基は、ヒトとして維持した。この変異体は、直鎖” CDRスワップ” と記載するのが最も良いであろう。F(a b)-1は、検出できる、I g E のレセプターへの結合の阻害を示さなかった(表3)。このような” CDRスワップ” 変異体が、その抗原に結合しないことは既に報告されている。Carterら、上記;Tempestら、上記。表3にはF(a b)-1の正確な配列は記載されていないが、この配列が、対応するヒト残基に対する置換M a E 1 1 マウスKabatCDR残基(括弧内に示す)によって推測することができることに注意すべきである。図1は、右手及び左手の括弧によってKabatCDRを示すが、C h o t h i a C D R は下線で示す。

解釈を助けて混乱を抑制するために、ヒト残基は通常書体で、マウス残基は斜体字で記載した。残基の置換基が示された場合、第1の残基は置換され、第2は挿入され、そして数は天然配列のKabat表示である。

F(a b)-2 変異体は、分子モデル化に基づく。この分子において、幾つかのマウスフレームワーク残基がヒトフレームワークに組み込まれた。F(a b)-2

において、上掲のKabatらによって与えられたCDRの定義（種間の配列可変性に基づく）が、CDR-H1及びCDR-H2を除いて使用された。

配列可変性（Kabatら）に基づくCDR-H1の定義は、抗体-抗原複合体の結晶学的研究（Chothiら）に基づくものとの間で顕著に異なる（図1）。従って、CDR-H1は両方の定義、すなわちヒト残基26-35を含むように再定義した。

配列可変性（Kabatら）に基づくCDR-H2の定義は、抗体-抗原結晶構造（Chothiら）に基づくものより多くの残基を含んでいる〔図1参照：KabatCDRは括弧により、Chothiaは下線より定義した〕。抗体ヒト残基60-65に接触する抗体-抗原を示した結晶構造は見出せなかったため、CDR-H2を修飾して両方の定義のハイブリッド、例えばヒト残基50-58を含むように修飾した。その結果、F(a b)-2において、F(a b)-1と比較して短いバージョンのCDR-H2を用いた。

結果として、最小量の電荷でF(a b)-2がヒトからマウス残基まで生成され、それらは結合を維持するのに必要とされると思われた。埋め込まれた残基のCDRのコンホメーションへの影響を試験し、並びに、重要なフレームワーク残基の分子モデル化の予測可能な効果を評価し、他の興味深い残基を試験するために、さらに10の変異体を生成した。

埋め込まれた残基のCDRコンホメーションへの影響を試験するために、マウス残基をヒトのものに戻したF(a b)-3からF(a b)-7を構築した。表4に（F(a b)-3及びF(a b)-4によって）示すように、VL4及びVL33における側鎖は、ヒト化抗体の結合及びおそらくCDR-L1のコンホメーションに最小の効果を有する。

モデル化は、フレームワーク残基VH24がCDR-L1コンホメーションに影響し、VH37がVH-VH界面に影響しうることを示唆した。しかしながら、ヒト残基のVH24〔F(a b)-5〕またはVH37〔F(a b)-7〕への置換は、結合の最小の抑制を示した。これに対して、フレームワーク位置VH

78におけるマウスPheのヒトLeu〔F(a b)-6〕への置換は、結合のか

なりの抑制を生じた。モデルは、この残基がCDR-H1及び／またはCDR-H2のコンホメーションに影響していることを示唆した。

F(a b)-9からF(a b)-12を、ヒト残基のマウスでの置換で試験した。これら4つの変異体全ては、F(a b)-2に比較してかなりの結合性の向上を示した(表3、4及び図3参照)。F(a b)-2により5倍向上した結合性を示すF(a b)-9において、(Kabatら、上記で定義された)CDR-H2における2つの残基を、マウス残基:Ala VH60 Asn及びAspH61 Proに換えた。Pro置換は、CDR-H2コンホメーション及び／または剛性を変化させ、Asn H60は、VL-VH界面に予め埋め込まれ、Asp VL1と相互作用可能である。

F(a b)-2に比較してかなり向上した結合性を示すF(a b)-10は、VL及びVHドメインの両方に埋め込まれた(フリーなアミノ酸の5%未満のアクセス可能な表面領域を持つ残基と定義された)全ての残基がマウスMaE11のものである変異体である。要するに、F(a b)-10は、VH及びVLにおいて唯一露出された、非-CDR残基がヒト残基に換えられたマウスMaE11と考えられる。

F(a b)-10の向上した結合性が1又は幾つかの残基によるものか否かを決定するために、変異体F(a b)-11及びF(a b)-12を生成した。F(a b)-2ではなく、F(a b)-9をこれらの変異体を調製するためのベーステンプレートとして用いたが、これは5倍向上した結合性を示すからである。モデル化は、VH63及びVH67の側鎖がCDR-H2のコンホメーションに影響しうることを示唆した。VH63は、Kabatら、上記に定義されたCHR-H2の一部であるが、Chothiaら、上記に定義されたものではないと考えられる。VH67は、両方の定義のフレームワーク残基であると考えられる。F(a b)-11において、VH63及びVH67は、各々マウス残基Leu及びIleであった。F(a b)-12において、VH67のみがマウスIleに換えられた。

両方の可溶性レセプター(表4)及び細胞ベースのアッセイ(表4、図3)において、変異体F(a b)-11及びF(a b)-12の両方が、少なくともF(a

b)-10と同等に良好で、F(a b)-9より良い結合性を示した。このことは、F(a b)-10の向上した結合性が、マウス残基内部のVHドメインの再パッキングではなく、単一の残基VH67の影響によるものであることを示唆している。

ヒトVL55残基GluをマウスGlyに置換し、VL57においてGlyのGluへの同様の置換をすることによりF(a b)-8を構築した。F(a b)-2はヒト残基を用いたが、F(a b)-8は、これらの位置でマウス残基を用いた。表3に簡潔にまとめたように、これらの残基の置換はレセプター結合に何ら衝撃を与えない。

表3

ヒト化Ma e l 1 変異体

変異体	F(ab)-2からの 変化 ^(a)		50%阻害おける濃度 (ng/ml)平均, 標準偏差 ^(b)	F(ab)-X F(ab)-2	F(ab)-X MaElI
	VL	VH			
F(ab)-1	<i>Leu 4 Met</i> <i>Arg 24 Lys</i> <i>Glu 55 Gly</i> <i>Gly 57 Glu</i>	<i>Val 24 Ala</i> <i>Ile 37 Val</i> <i>Thr 57 Ser</i> <i>Ala 60 Asn</i> <i>Val 63 Leu</i> <i>Gly 65 Asn</i> <i>Phe 78 Leu</i>	> 100,000	>16.0 ^(c)	>560
F(ab)-2	-	-	6083, 1279	1.0	34
F(ab)-3	<i>Leu 4 Met</i> <i>Met 33 Leu</i>	--	9439, 508	1.6	53
F(ab)-4	<i>Leu 4 Met</i>	--	6770, 349	1.1	3.8
F(ab)-5	--	<i>Val 24 Ala</i>	9987, 733	1.6	52
F(ab)-6	--	<i>Phe 78 Leu</i>	17,537, 4372	2.9	24
F(ab)-7	--	<i>Ile 37 Val</i>	8622, 107	1.4	48

F(ab)-8	Glu 55 <i>Gly</i> Gly 57 <i>Glu</i>	--	5799, 523	1.0	32
F(ab)-9	--	Ala 60 <i>Asn</i> Asp 61 <i>Pro</i>	1224, 102	0.20	6.8
F(ab)-10	Ala 13 <i>Val</i> Val 19 <i>Ala</i> Val 58 <i>Ile</i> Leu 78 <i>Val</i> Val 104 <i>Leu</i>	Val 48 <i>Met</i> Ala 49 <i>Gly</i> Ala 60 <i>Asn</i> Val 63 <i>Leu</i> Phe 67 <i>Ile</i> Ile 69 <i>Val</i> Met 82 <i>Leu</i> Leu 82c <i>Ala</i>	842, 130	0.14	4.7
F(ab)-11	--	Ala 60 <i>Asn</i> Asp 61 <i>Pro</i> Val 63 <i>Leu</i> Phe 67 <i>Ile</i>	416, 66	0.07	2.3
F(ab)-12	--	Ala 60 <i>Asn</i> Asp 61 <i>Pro</i> Phe 67 <i>Ile</i>	501, 84	0.08	2.8
MaE11	--	--	179, 63	0.03	1.0

(a) マウス残基は斜体字で記載し；残基番号はKabatらに従った。

(b) 3つの可溶性レセプターアッセイの平均及び標準偏差。

(c) $F(ab)X/F(ab)-2$ 比 >16 は、この変異体を用いた最も高い $F(ab)$ 濃度においても結合性を示さなかったことを意味する。

マウスMaE11に最も近い結合性を有すると決定された $F(ab)$ 変異体、即ち、 $F(ab)-2$ 、 $F(ab)-9$ 、 $F(ab)-10$ 及び $F(ab)-12$ を、全長IgG1分子の生成に用いた。変異体 $F(ab)-2$ またはMaE11に比較した

これらの分子の結合性は、 $F(ab)$ フラグメントで示された結合性に匹敵するものであった。これらの結果を表4に示す。

表 4

ヒト化MaE11 IgG1変異体

全長変異体	50%阻害における濃度 (ng/ml)平均,標準偏 ^{a)}	変異体X IgG1-2 ^{b)}	変異体X MaE11
IgG1-2	7569, 1042	1.0	16.9
IgG1-9	3493, 1264	0.46	7.8
IgG1-10	1118, 172	0.15	2.5
IgG1-12	1449, 226	0.19	3.2
MaE11	449, 53	0.06	1.0

MaE11のIgE-担持FcεRIへの結合：

マウスMaE11は、フリーなIgEのマスト細胞上のFcεRIへの結合を妨害するが、IgE-担持FcεRIへの結合によるヒスタミン放出はトリガーしない。図4に示すように、マウスMaE11及びヒト化変異体12（IgG1-12）の両方、並びにネガティブアイソタイプコントロール抗体MOPC21及びネガティブアイソタイプコントロールヒト化4D5（Carterら、上記）は、CHO 3D10細胞上のIgE-担持FcεRIに結合しなかった。これに対して、IgEには結合するがIgEのFcεRIへの結合を防止しないマウスMaE1抗体は、IgE-担持FcεRIに結合した。ヒトIgG1コントロール（ヒト化4D5）とは異なり、マウスIgG1アイソタイプ（MOPC21と表現）は、これらの細胞に約10%の非特異的なバックグラウンド結合を示した。MaE11は、MOPC21コントロールの上方に染色を与えず、ヒト化変異体12は、ヒト化4D5コントロールの上方に染色を与えなかった（図4）。

IgE結合に重要なCDR残基の部分的アラニンスキャンニング：

MaE11 CDRの配列は、荷電した残基が優勢であることを示す（図1）。CDR-L1は3つのAsp残基を含むが、CDR-L3はHis、Glu及びAspを有する。CDR-H3は、3つのHis残基を有する。マウス及びヒト化MaE11のモデルは、これら荷電残基の全てが空間的に接近していることを示した（図示せず）。これに対して、CDR-H2のAsp54のみは、他の荷電

残基と空間的に離間していた。アラニンは、部位指向性突然変異 (Kunkel, T. A. (1985), Proc. natl. Acad. Sci. USA 82:488) によって、これらの荷電残基の各々に置換されて変異体を生成した。CDR-L1において、3つのAsp残基の1つ、Asp VL32bの変換は、IgE結合を有効に低下させたが [F(a b)-16; 表5]、他のAsp残基の置換は最小の効果しか持たなかった [F(a b)-14; F(a b)-15]。CDR-L3においてGlu VL93及びAsp VL94を同時にアラニンに変換すると [F(a b)-17; 表5] 結合性は低下したが、VL32における置換とは程度が異なっていた。CDR-H3における3つのHis残基を個々にAlaに置換すると、僅かに向上した結合性 [F(a b)-21]、または結合性の1/3への低下 [F(a b)-20及びF(a b)-22] のいずれかとなった。しかし、3つのHisを同時に置換すると結合性が無くなった [F(a b)-19]。荷電残基がIgEへの直接結合に含まれるのか、あるいは、各々のCDRに幾分のコンホメーション的安定性を与えるのかを決定するのは容易ではないが、変異体F(a b)-13からF(a b)-20は、CDR-L1及びCDR-H3がIgE結合における重要な決定基であることを示した。

表5

ヒト化Maell F(ab)CDR残基変異体

変異体	F(ab)-2 からの変化 ^(a)		50%阻害における濃度 (ng/ml)平均,標準偏差 ^(b)	F(ab)-X F(ab)-2
	VL	VH		
F(ab)-2	--	--	6083, 1279	1.0
F(ab)-13	<i>Asp 30 Ala</i> <i>Asp 32 Ala</i> <i>Asp 32b</i> <i>Ala</i>	--	> 100,000	>16.0 ^(c)
F(ab)-14	<i>Asp 30 Ala</i>	--	3452, 183	0.57
F(ab)-15	<i>Asp 32 Ala</i>	--	6384, 367	1.0
F(ab)-16	<i>Asp 32b</i> <i>Ala</i>	--	> 100,000	> 16.0
F(ab)-17	<i>Glu 93 Ala</i> <i>Asp 94 Ala</i>	--	17,456, 7115	2.9
F(ab)-18	--	<i>Asp 54 Ala</i>	2066, 174	0.34
F(ab)-19	--	<i>His 97 Ala</i> <i>His 100a</i> <i>Ala</i> <i>His 100c</i> <i>Ala</i>	> 100,000	> 16.0
F(ab)-20	--	<i>His 97 Ala</i>	19,427, 8360	3.2
F(ab)-21	--	<i>His 100a</i> <i>Ala</i>	2713, 174	0.45
F(ab)-22	--	<i>His 100c</i> <i>Ala</i>	15,846, 8128	2.6

(a) マウス残基は斜体字で記載し；残基番号はKabatらに従った。

(b) 3つの可溶性レセプターアッセイの平均及び標準偏差。

(c) F(ab) X/F(ab)-2比>16は、この変異体を用いた最も高いF(ab)濃度においても

結合性を示さなかったことを意味する。

まとめと結論

MaE11からの機能的、ヒト化マウス抗IgE抗体の生成は、幾つかのマウスフレームワーク残基のヒトフレームワークへの置換を含む。さらに、荷電したCDR残基のマッピングは、これらの中に抗体-IgE相互作用において重要なものがあることを示した。

以前の研究 (Carterら, 上記; Shearman, C. W. ら (1991), J. Immunol. 147:4366; Kettleborough, C. A. ら (1991), Protein Eng. 4:773; Tempest, P. R. (1991), Biotechnology 9:266) と一致して、変異体F(ab)-1からF(ab)-12は、フレームワーク残基が抗体機能に重大な効力を有し得ることを示す。これは、6つのマウスCDRのみがヒトフレームワーク残基に移植された直鎖CDRスワップであるF(ab)-1を考えるとときに特に強調される。この説明はCDR-H2も含む。位置VH63及びVH67に埋め込まれた疎水性残基は、CDR-H2のコンホメーションに影響しうる。変異体は、位置VH63及びVH67における4つの組み合わせ、即ち、マウスLeuとIle、各々 [MaE11とF(ab)-11]、ValとPhe [F(ab)-2]、LeuとPhe [F(ab)-1]及びValとIle [F(ab)-12]を含んで生成された。これら4つの変異体の結合データからの明確な推論は、重要な残基がVH67であり、マウスMaE11に匹敵する親和性を与えるにはマウスIleでなければならないことを示している。F(ab)-1において、この残基はヒトPheであった。

[F(ab)-2に比較して] ヒトとして維持されたF(ab)-1の12残基のうち、8つを、他の変異体において別々にマウスに変換した。3つの変化: VL4 [F(ab)-4]; VL55及びVL57 [F(ab)-8]は、結合性に影響しなかった。2つの残基置換: VH60及びVH61 [F(ab)-9]は結合性を向上させたが、3つVH24 [F(ab)-5]; VH37 [F(ab)-7]及びVH78 [F(ab)-6]は結合性を低下させた。

変異体F(ab)-10は、マウス抗体免疫原性が露出されたフレームワーク残基のみを換えることにより抑制できることを提唱したPadlan (Padlan, E. A. (19

91), Mol Immunol. 28:489) によって示唆された仮説で設計された。この変異体において、疎水性はVL及びVHドメイン両方の内部であり、言い換えれば、この変異体は、VL及びVHの露出されたフレームワーク残基のみがヒト配列に変換されたマウスMaE11である。F(a b)-10はマウスMaE11と近い結合性を示すが、単一のアミノ酸ドメイン、VH67におけるヒトからマウスへの変換は、結合性において同等の向上をもたらした[F(a b)-12、IgG1-12]。

マウスMaE11に匹敵する結合性を示し、最も少ない電荷を必要とするヒト化変異体は、F(a b)-12であった。この変異体は、5つのヒトフレームワーク残基のみをマウスに置換したものである(VL4、VH24、VH37、VH67及びVH78)。これらの残基の4つは、分子モデル化で決定した。5番目のVH67、並びにCDR-H2残基VH60及びVH61は、分子モデル化を用いて、最初の変異体F(a b)-2の結合性を向上させるために含まれていた。

実施例3

ヒスタミン放出アッセイ

序文：

これは、抗体のアレルゲン-感受性RBL48細胞からのヒスタミン放出をブロックする能力に基づいて、組み換えヒト化モノクローナル抗IgE抗体の生物学的活性を定量的に測定するラットのマスト細胞ヒスタミンアッセイ(RMCHA)である。さらに、この測定法は、ヒトの体内に似た生理学的条件下で行われる。RBL48細胞系は、高親和性ヒトIgEレセプター(FcεRI)のα-サブユニットで逐次形質転換された親ラットマスト細胞系RBL2H3から誘導される。Gilfillan A.M ら, J. Immunol. 149 (7):2445-2451 (1992)。

方法：

RBL48細胞(Gilfillanら、上記)は、加湿した5%CO₂インキュベーター

(Fischer, モデル#610) 内のT175組織培養フラスコ(Falcon, #3028)中で、10%ウシ胎児血清、2mMグルタミン、及び500μg/mlの活性ゼラチン(Gibco, #860-1811)を添加したsIMDM、Iscoveの変性ダルベッコ媒質

中、37℃で成長させた。細胞を、PBS/0.05%、トリプシン/0.53 mM EDTAの溶液4 mLに37℃で2分間さらして収穫した後、遠心分離(400 x g、10分)し、新鮮なs IMDMに再懸濁した。懸濁物中の細胞をヘモサイトメータ(Reichert-Jung)で数え、密度を 0.4×10^6 細胞/mLに調整した。次いで、細胞を、96ウェルのU字型組織培養プレート(Linbro)の内側の60ウェルに、100 μ l/ウェル(ウェル当たり40,000細胞)で播種し、加湿した5% CO₂インキュベータ内で、37℃において24時間培養した。(吸引を介して)200 μ l/ウェルのs IMDMで1回洗浄した後、細胞を、ブタクサ(ragweed)-特異的IgE(RS IgE、10 ng/mL、23.48 ng/mLトータルIgE、1.43%ブタクサ-特異的ヒト血漿、North American Biological, ロット#42-365054)を含む90 μ l/ウェルのアッセイ希釈液(s IMDM; 3 U/mL Na-ヘパリン)とともに30分間プレインキュベートした。

プレインキュベーション時間の後、抗IgE抗体(アッセイ希釈剤で希釈、0.06-39.4 μ g/mL)またはアッセイ希釈液(全ヒスタミン放出、バックグラウンド、及びブタクサ対照に対して)のいずれか10 μ l/ウェルを細胞に添加し、プレートを、インキュベータ内で5% CO₂中37℃で24時間インキュベートした。インキュベーションの後、細胞を吸引し、200 μ l/ウェルのs IMDMで3回洗浄した。洗浄に続いて、細胞を、(1)0.5% triton溶液(全ヒスタミン放出用)、(2)ヒスタミン放出緩衝液(HRB、50% D₂O、0.8% NaCl、1.3 mM CaCl₂、s IMDM)、または(3)ブタクサ抗原(HRB中のNIH#A-601-903A-185、0.1 μ g/mL)のいずれか100 μ l/ウェルとともに37℃で30分間インキュベートし、氷上に移すことにより反応を停止させた(100% D₂O=100% D₂O、0.8% NaCl、1.3 mM CaCl₂)。

プレートを4℃において900 x g (2460 rpm)で5分間遠心分離し、

上清を収穫し、ヒスタミン酵素免疫アッセイキット(Immunotech #1153)を用いるヒスタミン測定のためにPBS中に1/80(ヒスタミン放出コントロール用

にPBS中1/1000)に希釈した。上清(100 μ l/ウェル)をアシル化パウダーを含むアシル化チューブ(キット内)に移し、50 μ lのアシル化緩衝液(キット内)と30分間室温で反応させた。アシル化したヒスタミン(50 μ l/ウェル)は、次いで複合プレート(キット内)に移し、200 μ l/ウェルのヒスタミン-アセチルコリンステアラゼ複合体(キット内)とともに4℃で18時間インキュベートした。

このインキュベーションの後、ウェルをブロットし、300 μ l/ウェルの洗浄緩衝液(Immunotech kit, #1153)で4回洗浄することによりリンスして未結合の複合体を除去した。色素形成性物質(アセチルチオコリン、ジチオニトロベンゾアート、200 μ l/ウェル、キット内)を添加し、暗中室温で30分間インキュベートした。停止溶液(50 μ l/ウェル、キット内)を添加して反応を停止し、620 nm基準で405 nmでの吸収を、SLT 340 ATTCプレート読み取り機で測定した。吸収強度は、(酵素免疫アッセイキット、AMACからの)ヒスタミン標準曲線から決定した(nMで表した)ヒスタミン濃度に反比例した。全ヒスタミン放出パーセントは、ヒスタミン濃度のデータから計算し、パーセント阻害は100%-全ヒスタミン放出阻害から計算した。結果を図5に示す。

概要及び結論

抗IgEモル比対ブタクサ誘発性ヒスタミン放出のパーセント阻害のグラフは、e26抗体のF(ab)形態が、e25のF(ab)形態よりも優れたブタクサ誘発性ヒスタミン放出特性を有することを示している。E26は、ブタクサ誘発性ヒスタミン放出を投与量に依存する阻害を示し、半最大阻害(half-maximal inhibition)のモル比は44:1(抗IgE:RSIgE)である。これに対して、e25は、ブタクサ誘発性ヒスタミン放出を、極めて高いモル比においてのみ阻害する(抗IgE:RSIgE200:1から1550:1の間)。e25曲線についての半最大阻害モル比は、400:1から500:1と見積もられる。従って、分子の結合親和性の尺度である半最大阻害モ

ル比のデータに基づいて、e26分子はRSIgEにe25分子の約10倍良好に結合する。

実施例 4

ファージ表示実験

序文：

この実施例は、一価のファージ表示 (display) 及び $E25$ ヒト化抗 IgE 抗体から誘導される $F(ab)$ フラグメントの選択を通して生成される、特異的親和性の向上した抗 IgE 抗体を記載する (Prestaら, *J. Immunol.* **151**:2623 (1993))。

方法：I. 一価の $F(ab)$ -ファージライブラリーの構築

幾つかの $F(ab)$ ライブラリーを構築した。出発ベクターとして、($IsoA$ $s p$ 異性を排除するため) VL 置換 $D32E$ を含む $e25$ 変異体を、バクテリオファージ $M13gp$ の C -末端ドメインに、周知の技術、例えば Bassら, *Proteins* **8**:309 (1990) によって融合させた。このプラスミドは、図 10 に現れる $p426$ として知られる。第 1 に、“野生型” $F(ab)$ -ファージ、 $p426$ を、ライブラリー特異的“停止”テンプレートの構築のためのテンプレートとして用いた。停止コドン (TAA または TGA) を導入することにより、原分子を不活性とし、それによりバックグラウンドの影響、及び、ライブラリー構築のための突然変異誘発段階でのテンプレート特異的な (ハイブリダイゼーション) バイアスを抑制した (Lowman 及び Wells, *Methods: Comp. Methods Enzymol.* **3**:205 (1991))。これらのテンプレートは、一本鎖のテンプレート指向性突然変異を用いて構築し (Kunkelら, *Methods Enzymol.* **204**:125 (1991))、オリゴヌクレオチドを表 10 に列挙した。

続いて、これらの停止テンプレートを、突然変異誘発の第 2 ラウンドに使用し、表 11 に列挙したオリゴ類を用いて、示した各 CDR 領域においてライブラリーを生成した。 NNS 変性コドンは、示した各 CDR 領域において全 20

のアミノ酸を生ずるために用いた (ヌクレオチド塩基は一文字 $IUPAC$ 命名法で示す: $N=A, G, C$ または T ; $S=G$ または C)。 NNS 変性コドンは、32 の異なる可能なコドンを用いて、ランダム化した各位置に全 20 のアミノ酸を

生ずるために使用した。アンバー停止コドン (TAG) は、ここで用いるサブプレッサ系、即ち supE サプレッサ株 XL-1 ブルー ; Bullock ら, *Biotechniques* 5, 376 (1987) において Gln をコードする。重鎖抗体ドメインとファージ上の gp3p ドメインとの間にアンバーコドンが存在することにより、E. coli のアンバーサブプレッサ株においてのみファージ表示された融合タンパク質が発現できるが、E. coli の非-サブプレッサ株においては、同じ構築物で可溶性 Fab タンパク質が得られる (Lowman ら *Biochemistry* 30:10832 (1991) ; Lowman 及び Wells, *Methods Comp. Methods. Enzymol.* 3:205 (1991) ; Hoogenboom ら, *Nucl. Acids Res.* 19:4133 (1991))。しかしながら、他の E. coli ファージ発現系における他の停止コドンは、当業者には明らかである。

ランダム突然変異誘発反応の産物は、エレクトロポレーションによって E. coli 細胞 (Stratagene, XL-1 Blue) に形質転換し、M13KO7 ヘルパーファージとともに 37℃ で終夜成長させることにより増幅した (Vierra 及び Messing, *Methods Enzymol.* 153: (1987))。

表10

第1ラウンド突然変異誘発のための停止-テンプレートオリゴ類

オリゴ 配列番号	領域	配列
HL-208	VL1	ACC TGC CGT GCC AGT TAA TAA GTC TAA TAA GAA GGT GAT AGC TAC
HL-209	VH3	GCC AGT CAG AGC GTC TAA TAA TAA GGT TGA AGC TAC CTG AAC TGG T
HL-210	VH3	TGT GCT CGA GGC AGC TAA TAA TAA GGT TAA TGG TAA TTC GCC GTG TGG GG
HL-220	VL2	G AAA CTA CTG ATT TAC TAA TAA TAA TAA CTG GAG TCT GGA GTC
HL-221	VL3	CT TAT TAC TGT CAG CAA AGT TAA TAA TAA CCG TAA ACA TTT GGA CAG GGT ACC
HL-222	VH1	G TCC TGT GCA GTT TCT TAA TAA TAA TAA TAA TCC GGA TAC AGC TGG
HL-223	VH1	GCC TAC TCC ATC ACC TAA TAA TAA AGC TGA AAC TGG ATC CGT CAG
HL-224	VH2	GG GTT GCA TCG ATT TAA TAA TAA GGA TAA ACT TAA TAT AAC CCT AGC CTC AAG
HL-225	VL1	AAG CCG GTC GAC AGG TAA TAA GAT TAA TAC TAA AAC TGG TAT CAA CAG

表11

第2ラウンド突然変異誘発のためのライブラリー特異的、変性オリゴ類

HL-212	VL1	ACC TGC CGT GCC AGT NNS NNS GTC NNS NNS GAA GGT GAT AGC TAC
HL-213	VH3	GCC AGT CAG AGC GTC NNS NNS NSS GGT NNS AGC TAC CTG AAC TGG
HL-214	VH3	TGT GCT CGA GGC AGC NNS NNS NNS GGT NNS TGG NNS TTC GCC GTG TGG GG
HL-231	VL2	G AAA CTA CTG ATT TAC NNS NNS NNS NNS CTG GAG TCT GGA GTC
HL-232	VL3	CT TAT TAC TGT CAG CAA AGT NNS NNS NNS CCG NNS ACA TTT GGA CAG GGT ACC
HL-233	VH1	G TCC TGT GCA GTT TCT NNS NNS NNS NNS NNS TCC GGA TAC AGC TGG
HL-234	VH1	GTT TCT GGC TAC TCC ATC ACC NNS NNS NNS AGC NNS AAC TGG ATC CGT CAG
HL-235	VH1	GG GTT GCA TCG ATT NNS NNS NNS GGA NNS ACT NNS TAT AAC CCT AGC GTC AAG
HL-236	VL1	AAG CCG GTC GAC AGG NNS NNS GAT NNS TAC NNS AAC TGG TAT CAA CAG

II. フェージ結合選択:

F(a b) 変異体を表現するフェージ粒子の親和性選択のために、E. coli 培地上清から塩化ナトリウム/ポリエチレングリコール (NaCl/PEG) 沈

降によりファージを調製した。このファージをPBS緩衝液に懸濁し、次いで0.05%のTween™-20を含むウマ血清（カタログ番号A-3311-D, Hyclone, Logan, UT）中に希釈し、同様に非-表示ファージをネガティブコントロールとした。ポジティブコントロールとして、“野生型” e426F(a b)-ファージを非-表示ファージと混合し、モック選択を施した。

Maxisorp 96 ウェルプラスチックプレート（Nunc）を、50mM炭酸ナトリウム緩衝液、pH9.6中の2 μ g/mlのIgE（ヒトIgE, Genentechロット#9957-36）で、4℃において終夜コートした。次いで、IgE溶液を除去し、プレートをウマ血清のブロッキング溶液（Tween™-20無し）とともに、室温で2時間インキュベートした。

ブロッキング溶液を除去し、プレート上においてファージ溶液を室温で1時間インキュベートした。その後、ファージ溶液を除去し、プレートをPBS/Tween™-20（0.05%）緩衝液で10回洗浄した。ウェルをPBS/Tweenで満たし、さらに10分間インキュベートし、その後再びプレートを10回洗浄した。

プレートに結合したままのF(a b)-ファージを、Tris-HClで中性化した20mMのHCl、pH8で溶離し、上記のヘルパーファージで成長させた。ファージのアリコートを順次希釈し、新鮮なXL-1ブルー細胞と混合し、適当な抗生プレートにプレートし、F(a b)-表示（カルベニシリン耐性；CFUa）または非-表示（クロロアンフェニコール耐性；CFUc）の溶離されたファージのCFU（コロニー形成単位）の数を数えた。各ラウンドにおける非-表示ファージに対するF(a b)-表示の富化(Emut)を、溶離プールでの(CFUa/CFUc)を最初のプールでの(CFUa/CFUc)で除することにより計算した。野生型コントロールファージについての富化(Ewt)を同様にして計算した。

親和性選択の次のラウンドは、最初の10回の洗浄に続くインキュベーション時間を各ラウンド毎に増大させた以外は、上記のようにして実施した。緊縮条件を増大させてゆくラウンドからラウンドへのファージ選択の効率を比較するた

め、各ラウンドの富化係数を野生型コントロールに規格化した。各プールについての結合富化の野生型に対する比率 (E_{mut}/E_{wt}) を図6に示す。平衡においては高親和性変異体フラクションの方が低親和性変異体より多く IgE プレートに結合するので、高親和性の変異体をより効率的に回収しなければならず、従って、より大きな相対的富化を表示する。確かに、VL1 ライブラリーは、5-6 ラウンドの選択の後、野生型の約10倍まで大きな相対的富化まで順次向上する相対的富化を示した。この測定により、VL1 ライブラリーは、VH3 ライブラリーよりも、野生型に対して大きな親和性の向上を示した。これら2つのCDR ライブラリーの組の間の結果のばらつきは、VL1 による抗体結合へのより大きなエネルギー的寄与を反映しているとも言える。逆に、e25のVH3 CDRは、既にVL1 CDRより最適なIgE結合に近く、そのために、側鎖置換機を介してVL1が寄与する結合相互作用における相対的向上をより大きくしていると考えられる。

DNA配列は、最初のVL CDR1 ライブラリー (ランダム化位置27, 28, 39及び31) からの最大のF(ab)-ファージ変異体が、野生型残基D30、及び好ましくは変異したY31Gを保持していることを示した(表15、ここで、ラウンド3からのクローンは212-3.xで示し、ラウンド6からのもの212-6.xで示した)。Q27及びS28の位置に種々の置換が見られるが、6ラウンドの選択後のファージプールでは、Q27K及びS28Pを含むクローンが優勢であった。このクローンは、好ましい残基D30及びG31も含み、この側鎖の組み合わせがIgE結合に最適であることを示唆している。

第2のVL CDR1 ライブラリー (ランダム化位置30, 31, 32及び34) において、殆どの選択物がD30及びE32に野生型残基を保持しており; 配列されたクローンの中にのみ野生型D34が観察された。このライブラリーでは、Y31において種々の型の残基が観察された。さらに、2つのクローン、213-6.7及び213-6.8に偽性突然変異、G33Sが観察された(表15)。

3ラウンドの選択後のVH CDR3 ライブラリーからのクローンの配列分析は、このライブラリーが、実質的に単一のクローン、即ち、101-103の位

置に野生型残基を持ち、置換基H105T及びH107Yを持つ214-3.1に変換されたことを示した(表15)。

I V. 選択されたF(a b)クローンのファージ-ELISAアッセイ

ファージ-結合選択の結果を評価するために、ファージをE. coli XL-1ブルー細胞中に形質転換し、液体培地中で成長させるか、抗生物質含有プレート上にプレートした。競合的-ファージ-ELISA (Cunninghamら, EMBO J. 13:2508 (1994); Lowman, Chapter 24, in *Methods in Molecular Biology*, vol. 87, S. Caibilly (ed.), Humana Press Inc., Totawa, NJ (1997)) による配列及び結合アッセイのために、これらのプレートからクローンをランダムに取った。

相対的IgE結合親和性を評価するために、ファージを上記の様にIgEでコートしたプレート上で滴定して表示されたF(a b)濃度を規格化した。ファージは、順次希釈したIgEとプレミックスし、次いでIgEコートしたプレートに添加し、室温で1時間インキュベートした。次いで、プレートをPBS/Tweenで10回洗浄し、セイヨウワサビペルオキシダーゼのヤギ-抗-ウサギ複合体を混合したウサギ抗-ファージ抗体溶液を添加した。室温で1時間インキュベートした後、プレートを色素生成物質、o-フェニレンジアミン(Sigma)で発色させた。1/2容量の2.5MのH₂SO₄を添加して反応を停止させた。490nmにおける吸光度を分光分析プレートリーダーで測定した。各変異体のIC₅₀を、各データ組への4-パラメータのカーブフィッティングにより決定した(Lowman, *Methods in Mol. Biol.*, 上記)。各クローンファージ変異体の相対的結合親和性は、そのIC₅₀の、最初のファージe426に対する比率として定義した(表15-16)。

幾つかの場合、与えられた選択のラウンドからのファージプールをフロー(enmasse)で試験し、IgEに対する集団の平均相対親和性(IC₅₀(wt)/IC₅₀(変異体))を見積もった。例えば、VL CDR1ライブラリー、残基32、33、35及び37は、5ラウンドの選択の後にe426に対して3.6

倍の親和性の向上しか示さなかったにもかかわらず、このライブラリーの親変異体(e26)は25倍の向上した親和性を示した。従って、これら特別な残基の

VL-CDR1ライブラリーは、更に精製しなかった。一方、VH CDR2ファージプールは、その親e426ファージより6.2倍向上した親和性を示した。

また、ファージライブラリーは、CDRドメインVL CDR2、残基54-57及びVL CDR3、残基96-98、99及び100でも生成した。しかし、これらの位置のアミノ酸置換は、e426を越える富化を生じなかった。VH CDR1、残基26-30について生成したファージライブラリーも、e26を越える富化を生じず、汚染e26-ファージが優勢であることがわかった。このことは、最初のライブラリーに、e26より高い親和性の変異体が無いことを示唆している。

CDRドメインVL CDR1、残基27、28、30、31、32、34、並びにVHCDR1、残基101、102、103、105及び107のファージライブラリーを、表15に報告するが、VH CDR2は表16に報告する。表15及び16において、e26より適度に大きな親和性を示さなかったクローンライブラリーは、さらに精製することはせず、結合向上因子を決定しなかった。

表15

IgE結合選択からのF(ab)-ファージクローン類

ファージ クローン	VL CDR1残基						VH CDR3残基					結合性 向上の 倍数 (ファージ ELISA)
	27	28	30	31	32	34	101	102	103	105	107	
e426	Q	S	D	Y	E	D	H	Y	F	H	H	-1-
212-3.1	M	R	Y	G	---	---	---	---	---	---	---	「決定不

(x2)												能」
212-3.2	A	Y	N	G	--	--	--	--	--	--	--	3.5
212-3.3	G	G	Y	G	--	--	--	--	--	--	--	6.9
212-3.5	M	G	E	A	--	--	--	--	--	--	--	「決定不能」
212-6.1	E	Q	D	W	--	--	--	--	--	--	--	23
212-6.2	E	R	E	S	--	--	--	--	--	--	--	「決定不能」
212-6.4	E	H	D	W	--	--	--	--	--	--	--	23
212-6.5	S	N	S	G	--	--	--	--	--	--	--	「決定不能」
212-6.6	K	E	D	S	--	--	--	--	--	--	--	「決定不能」
212-6.7 (x8) (e26)	K	P	D	G	--	--	--	--	--	--	--	25
212-6.15	R	P	D	T	--	--	--	--	--	--	--	「決定不能」
212-6.16	R	S	D	G	--	--	--	--	--	--	--	「決定不能」
212-6.17	V	T	H	S	--	--	--	--	--	--	--	「決定不能」
213-3.1	--	--	D	D	C	D	--	--	--	--	--	「決定不能」
213-3.2	--	--	H	D	S	D	--	--	--	--	--	「決定不能」
213-3.3	--	--	D	W	Q	D	--	--	--	--	--	8.8
213-3.4	--	--	G	D	H	D	--	--	--	--	--	3.7

213-6.1	--	--	E	R	W	D	--	--	--	--	--	「決定不能」
213-6.3 (x2)	--	--	D	T	E	D	--	--	--	--	--	14
213-6.4	--	--	D	W	E	D	--	--	--	--	--	20
213-6.7 G33S	--	--	H	N	E	D	--	--	--	--	--	「決定不能」
213-6.8 G33S	--	--	Y	S	N	D	--	--	--	--	--	14
213-6.9	--	--	W	G	E	D	--	--	--	--	--	「決定不能」
213-6.11	--	--	Y	S	E	D	--	--	--	--	--	「決定不能」
213-6-12	--	--	E	R	D	D	--	--	--	--	--	「決定不能」
213-6.13	--	--	H	E	E	D	--	--	--	--	--	「決定不能」
213-6.14	--	--	D	K	K	D	--	--	--	--	--	「決定不能」
213-6.15	--	--	D	R	Q	D	--	--	--	--	--	15
214-3.1 (x5)	--	--	--	--	--	--	H	Y	F	T	Y	2.7
214-3.6	--	--	--	--	--	--	H	Y	F	S	R	「決定不能」

表 1 6

VH CDR2ファージクローン類

ファージ クローン	V H C D R 2残基					結合性向上の 倍数
	53	54	55	57	59	
e426	T	Y	D	S	N	-1-
235-5.1	K	Y	S	E	K	「決定不能*」
235-5.2	K	W	H	E	M	「決定不能*」
235-5.3	K	W	W	E	A	「決定不能*」
235-5.4	H	Y	A	R	K	「決定不能*」
235-5.5	K	Y	H	G	A	「決定不能*」

*注：集団平均相対的ファージ親和性は、e 4 2 6 の 6. 2 倍向上したと見積もられた。

V. ファージスクリーニングからの組み合わせ突然変異

タンパク質内の異なる部位での突然変異は、タンパク質機能に付加的効果を示すことが多い (Wells, Biochemistry 29:8509 (1990))。従って、上記の最初のファージライブラリーからの幾つかの突然変異を、I g E への結合性を向上させるために組み合わせた。

抗 I g E 抗体の免疫原性の増大の可能性を抑制するために、E-2 5 からの突然変異の割合を最小にする必要があった。その結果、個々に測定したとき最も高い親和性の向上を示したファージ変異体からの突然変異のみを用いた。さらに、与えられたファージクローンが観察される頻度を、発現レベル及び／または蛋白質分解安定性に関連づけることができる (Lowman及びWells, 1991, 上記)。V L 1 ライブラリー、2 1 2-6. 7、e 2 6 とも命名される、からの一つの特別なクローンを選択したが、これは、ファージ-E L I S A アッセイにおいて e 4 2 6 に対して 2 5 倍の向上した親和性を示したからである。

また V H C D R 2 ライブラリーは、e 4 2 6 を越える向上した親和性を示したが、そのような向上は、プールしたファージについて測定すると、6. 2 倍

のみと測定された。プールされたファージの親和性は、全ての成員個々に測定しなくても、プールの成員の少なくとも幾つかの向上した親和性を示した。また、プールされたファージを用いることは、与えられたラウンドの後に、どれだけの親和性向上が見られるか、及び、親和性選択を続けるべきか否かを決定することを可能にする（即ち、プールの親和性が最大に到達すれば、続くラウンドがさらなる富化を与えるとは思われない）。このように、プールされた親和性データを用いることは、有用性の高いスクリーニング手段である。

VH CDR 2 ループは、結晶構造においても分子モデルにおいてもVL CDR 1 ループとは離間しているので、VH CDR 2 領域における突然変異が、VL CDR 1 におけるものに付加的に機能し得ることは明らかである。しかし、これらの突然変異の幾つかの組み合わせは、それにも関わらず両立しないので、我々は、4つの異なる組み合わせ突然変異：e 2 6 のクローン2 3 5-5. 1、2 3 5-5. 2、2 3 5-5. 3、及び2 3 5-5. 4（表1 7）に見られる突然変異との組み合わせを試験した。これらの構築物は、テンプレートとしてのe 2 6 F (a b)-ファージとともに、VH 2 突然変異をコードする変異性オリゴ類を用いて、Kunkel突然変異誘発によってなされた（Kunkelら, Methods Enzymol. 204:125 (1991)）。

e 2 6 におけるVL CDR 1 突然変異とクローン2 3 5-5. 1、2 3 5-5. 2、2 3 5-5. 3、及び2 3 5-5. 4 におけるVH CDR 2 突然変異の組み合わせからの最終的な変異体を比較するために、ファージ-ELISA アッセイ（Lowman, Methods in Molecular Biology, vol. 87, Cabilly (ed.), Humana Press Inc., Totawa, NJ (1997)）を用いた。可溶性F (a b) タンパク質も調製し、ビオチン-IgE プレートアッセイにおいて比較し、以下の表1 7 及び図1 7 で報告する。

表 1 7

F (a b) フラグメント	I C 50 (n m)	相対的親和性 (向上した倍数)
e426	1. 5	-1-
e26	0. 17	8. 9
e27 (e26+235-5. 1)	0. 040	38
e695 (e26 + 235-5. 2)	0. 050	31
e696 (e26 + 235-5. 3)	0. 063	24
e697 (e26 + 235-5. 4)	0. 066	23

V I . ビオチンプレートアッセイ (F c E R I - I g E キメラ競合アッセイ)

序文：この実施例の目的は、I g E レセプターキメラでコートされたプレートに抗 I g E F (a b) 及びビオチン-I g E を同時に添加した場合、固定された高親和性 I g E レセプター I g G キメラと、液相でのビオチン化ヒト化 I g E への結合について競合する抗 I g E F (a b) がどのように異なるかを比較することである。抗 I g E F (a b) 濃度を上昇させると、プレート上のレセプターに結合できるビオチン I g E の量が減少し、その結果、分光光度計で測定した吸光度が低下した。

Nuncのmaxisorpプレート (カタログ番号F96) を、100 μ l の1 μ g / m l ストック溶液を50 nm炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9. 6) 中に分割した100 ng / ウェルのF c ϵ R 1 - I g G (Haak-Frendshoら, J. Immunol. 151, 352 (1993), (Genentechロット#2148-74 (6. 4mg/ml)) で、4℃において12から24時間コートした。プレートをE L I S A 洗浄緩衝液 (P B S (pH 7. 4) 中の0. 05%ポリソルベート20 (Sigma)) で3回洗浄し、200 μ l のE L I S A アッセイ緩衝液 (T r i s 緩衝塩水、pH 4. 45、0. 05%のR I A 級ウシ血清アルブミン、Sigma ; 0. 05%ポリソルベート20及び4 mMのE D T A を含む) とともに60分間インキュベートしてブロックした。緩衝液による3回の洗浄の後、初期濃度200 nMで抗 I g E F (a b) をアッセイ緩

衝液で順次2倍に希釈した $100\mu\text{l}$ を、ELISAプレートに3回添加した。希釈は、Titertek (登録商標) マルチチャンネルピペットで実施した。アッセイバッファー ($100\mu\text{l}$ 、 0.5mg/ml ストックの $1/500$ 希釈) 中に入れたビオチニル化IgEを全てのウェルに添加し、混合物を小軌道シェーカー (Bellco) で 25°C において60分間インキュベートした。U266B1 骨髓腫 (ATCC TIB196) 培地上清からIgEを親和性で精製し、ビオシチンヒドラジドを用いてビオチニル化した (O' Shannessyら, Immunol Lett. 8:273 (1984); Pierce Chemical)。サンプルを洗浄緩衝液で5回洗浄し、結合したIgEを $100\mu\text{l}$ のペルオキシダーゼ-複合ストレプトアビディン (Zymed) で、 $1:3000$ において90分間検出した。次いで、サンプルを再度洗浄緩衝液で6回洗浄した後、 $100\mu\text{l}$ の基質溶液 (PBS中の $400\mu\text{g/ml}$ のo-フェニレンジアミン二塩酸塩及び 4mM の H_2O_2) を添加し、6分間インキュベートした。次いで、 4.5M の H_2SO_4 ($100\mu\text{l}$) で反応を停止させ、Uvmaxミクロプレートリーダー (Molecular Devices) において 490nm の吸収を読み取った。e25、e26及びe27 F (a b) 抗体フラグメントの種々のF (a b) 濃度レベルでの吸収を図8にプロットした。

結論：図8のプロットは、高親和性レセプターに対して、E26及びE27の両方がE25より大きな親和性を有し、E27が最大の親和性を有することを示している。

V I I . 可溶性F (a b) タンパク質のB I A c o r e アッセイ

幾つかのF (a b) フラグメントのレセプター結合親和性を、BIAcoreTM-2000表面プラズモン共鳴システム (BIAcore, Inc.) を用いて測定した結合及び解離速度定数から計算した (Lofas及びJohnson, J. Chem. Soc. Commun. 21, 1526-1528 (1990))。バイオセンサーチップは、製造者 (BIAcore) の指示に従って、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩 (EDC) 及びN-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) を用いたIgEの共有結合のために活性化した。IgEは、 10nM の酢酸ナトリウム緩衝液 ($\text{pH} 4.5$) 中に希釈し、さらに約 $30\mu\text{g/ml}$ に希釈し、チップ上に注入して、固

定化された材料の800～12,400応答単位(RU)のシグナルを得た。RUのシグナルは固定化された材料の量に比例するので、これは、マトリクス上の固定化されたIgEが0.4～6.5 pmol/cm²の密度範囲にあることを示す。最後に、1Mのエタノールアミンをブロッキング剤として注入した。再生は4.5MのMgCl₂で行った。

速度論的測定のために、1.5倍希釈のFab抗体フラグメントを、PBS/Tween緩衝液(リン酸緩衝塩水中に0.05%Tween-20)中で、25℃において20μl/分の流速でIgEチップ上に注入した[図9]。

解離データを、1部位モデルに適合させて、k_{off}±s.d. (測定の標準偏差)を得た。各結合曲線について擬一次速度定数(k_s)を計算し、タンパク質濃度の価数としてプロットしてk_{on}±s.e. (適合の標準誤差)を得た。Fab:IgE結合の平衡解離定数、K_dは、SPR測定からk_{off}/k_{on}として計算した。解離したFabの再結合といった実験上の人為的結果無しに、観察された解離速度(off rate)は、Fab濃度には無関係であった。また、平衡解離定数、K_dはk_{off}に反比例するので、親和性の向上の見積りは、結合速度(k_{on})が全ての変異体について一定であると仮定して行うことができる。解離速度を、計算した解離の半減期とともに表18に示した。

表 1 8
解離定数

F (a b)	$K_{d,f} \times 10^{-4} (\text{秒}^{-1})$	$t_{1/2} (\text{分})$	向上(倍数)
e25	22 ± 4	5.3	-1-
e26	3.6 ± 0.2	41	7.7
e27 (e26 + 235-5.1)	0.98	118	22
e695 (e26 + 235-5.2)	0.94	122	23
e696 (e26 + 235-5.3)	1.4	83	16
e697 (e26 + 235-5.4)	1.5	77	15

V I I I . F (a b) 発現及び精製

抗 I g E F (a b) E - 2 5 (Prestaら, J. Immunol. 151:2623-2632 (1993)) 及び p 4 2 6 から誘導されたファージミド (phagemids) における変異体 (図 1 0) を、E. c o l i 株 3 4 B 8 において発現させた。2 Y T 媒質中のつまようじ (toothpick) 培地 (1 0 m l) を、5 0 μ g / m l のカルベニシリンとともに 3 7 $^{\circ}$ C で 8 時間インキュベートし、次いで 5 0 μ g / m l のカルベニシリンを含む 1 リットルの変性 A P - 5 に移し、3 7 $^{\circ}$ C で 2 4 時間インキュベートした。培地を、4 $^{\circ}$ C において、5 0 0 m l ボトル中、7, 0 0 0 r p m で 1 5 分間遠心分離した。ペレットを少なくとも 3 時間 - 2 0 $^{\circ}$ C で凍結させた。各 5 0 0 m l のペレットを、1 m M のペンズアミジン (Sigma) を含む 5 0 m M の p H 8. 0 の T r i s 中の 2 5 % 冷スクロース 1 2. 5 m l 中に 4 $^{\circ}$ C で懸濁した。懸濁物を 4 $^{\circ}$ C で 3 時間攪拌して可溶化させた。懸濁物を、4 $^{\circ}$ C において、1 8, 0 0 0 r p m で 1 5 分間遠心分離し、上清中に発現した F (a b) をタンパク質 G (Pharmacia) アフィニティクロマトグラフィで精製した。カラムを、1 0 m M

のTris (pH 7.6) 及び1mMのEDTA (pH 8.0) の溶液で洗浄し、Fabをカラムの2.5倍の容量の100mM酢酸 (pH 3.0) で溶離し、即座に0.5容量のpH 8.0の1M Trisで中性pHに戻した。溶離液は濃縮し、centricon 30マイクロセントレーター (microcentrator) (Amicon) でPBSに緩衝液交換した。タンパク質濃度は、分光光度計 (Beckman DU 64) で280nmの吸収によって測定し、サンプルの純度は、5%β-メルカプトエタノールでの還元条件下において4-20%のSDS PAGEゲル (Novex) を用いて見積もった。

IX. 結果と結論

ファージ-ELISA競合実験の結果は、e26 Fab-ファージは、e426に対して9倍の親和性の向上であったが、変異体e695、e696及びe697の組み合わせは、e426-ファージより20-40倍向上したことを示した。ファージ-誘導突然変異のさらなる組み合わせは、同様に向上した親和性を持つ抗体変異体を生じ得る。

Fab可溶性タンパク質をビオチン-IgEプレートアッセイで試験した場合、e26 Fab及びe27 Fabは、FcER1-IgGへのIgE結合阻害について、e25より各々約10倍及び30倍向上した。BIAcore分析による解離速度測定は、これらの相対的親和性を支持した。特に、e26及びe27は、e25より7.7倍及び22倍遅い解離速度を示した。半減期が長いことは、IgEが”占有され”、即ち、高親和性レセプターに長い間結合することができないことを意味し、従って、抗IgE治療的に潜在能力が向上したことになる。

このように、平衡及び速度論的結合データは、e26及びe26 Fabが、各々e25の約10倍及び30倍の緊密さでIgEに結合するという結論を支持している。対応するFab変異体を含む全長抗体 (IgG) は、e25 IgGと類似の相対的親和性を示すと予想される。

配列リスト

(1) 一般情報:

- (i) 出願人: ジェネンテック・インク
- (i i) 発明の名称: 改良抗1gE抗体とポリペプチドの改良方法
- (i i i) 配列の数: 26
- (i v) 通信住所:
 - (A) あて名: ジェネンテック・インク
 - (B) 通り: 1 DNA ウェイ
 - (C) 市: サウス サン フランシスコ
 - (D) 州: カルフォルニア
 - (E) 国: アメリカ合衆国
 - (F) 郵便番号: 94080
- (v) コンピュータ読取り可能形態:
 - (A) 媒体方式: 3.5インチ、1.44Mbフロッピーディスク
 - (B) コンピュータ: IBM・PC互換機
 - (C) 操作システム: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) ソフトウェア: ウィンパットイン(ジェネンテック)
- (v i) 現出願データ
 - (A) 出願番号:
 - (B) 出願日:
 - (C) 分類:
- (v i i i) 弁理士/代理人情報:
 - (A) 名前: スヴォボダ・クレイグ・ジー
 - (B) 登録番号: 39044
 - (C) 整理/ドケット番号: P1123PCT
- (i x) 遠距離通信情報:
 - (A) 電話: 650/225-1489
 - (B) テレファックス: 650/952-9881

(2) 配列番号: 1 の情報:

- (i) 配列の性質:
 - (A) 配列の長さ: 6127塩基対
 - (B) 配列の型: 核酸
 - (C) 鎖の数: 二本鎖
 - (D) トポロジー: 環状
- (x i) 配列: 配列番号: 1:

GAATTCAACT TCTCCATACT TTGGATAAGG AAATACAGAC ATGAAAAATC 50

TCATTGCTGA GTTGTATT TT AAGCTTGCCC AAAAAGAAGA AGACTCGAAT 100

GAACTGTGTG CGCAGGTAGA AGCTTTGGAG ATTATCGTCA CTGCAATGCT 150

TCGCAATATG GCGCAAAATG ACCAACAGCG GTTGATTGAT CAGGTAGAGG 200

GGGCGCTGTA CGAGGTAAAG CCCGATGCCA GCATTCCTGA CGACGATACG 250

GAGCTGCTGC GCGATTACGT AAAGAAGTTA TTGAAGCATC CTCGTCAGTA 300

AAAAGTTAAT CTTTTCACCA GCTGTCATAA AGTTGTCACG GCCGAGACTT 350

ATAGTCGCTT TGTITTTTATT TTTTAATGTA TTTGTAAC TA GAATTCGAGC 400

TCGGTACCCG GGGATCCTCT CGAGGTTGAG GTGATTTTAT GAAAAAGAAT 450
ATCGCATTTT TTCTTGCATC TATGTTTCGTT TTTTCTATTG CTACAAACGC 500
GTACGCTGAT ATCCAGCTGA CCCAGTCCCC GAGCTCCCTG TCCGCCTCTG 550
TGGGCGATAG GGTCAACATC ACCTGCCGTG CCAGTCAGAG CGTCGATTAC 600
GAAGGTGATA GCTACCTGAA CTGGTATCAA CAGAAACCAG GAAAAGCTCC 650
GAAACTACTG ATTTACGCGG CCTCGTACCT GGAGTCTGGA GTCCCTTCTC 700
GCTTCTCTGG ATCCGGTTCT GGGACGGATT TCACTCTGAC CATCAGCAGT 750
CTGCAGCCAG AAGACTTCGC AACTTATTAC TGTCAGCAAA GTCACGAGGA 800
TCCGTACACA TTTGGACAGG GTACCAAGGT GGAGATCAAA CGAACTGTGG 850
CTGCACCATC TGTCTTCATC TTCCCGCCAT CTGATGAGCA GTTGAAATCT 900
GGAAGTCTT CTGTTGTGTG CCTGCTGAAT AACTTCTATC CCAGAGAGGC 950
CAAAGTACAG TGGAAGGTGG ATAACGCCCT CCAATCGGGT AACTCCCAGG 1000
AGAGTGTCAC AGAGCAGGAC AGCAAGGACA GCACCTACAG CCTCAGCAGC 1050
ACCTGACGC TGAGCAAAGC AGACTACGAG AAACACAAAG TCTACGCCTG 1100
CGAAGTCACC CATCAGGGCC TGAGCTCGCC CGTCACAAAG AGCTTCAACA 1150
GGGGAGAGTG TTAAGCTGAT CCTCTACGCC GGACGCATCG TGGCCCTAGT 1200
ACGCAAGTTC ACGTAAAAAG GGTATCTAGA GGTGAGGTG ATTTTATGAA 1250
AAAGAATATC GCATTTCTTC TTGCATCTAT GTTCGTTTTT TCTATTGCTA 1300
CAAACCGTA CGCTGAGGTT CAGCTGGTGG AGTCTGGCGG TGGCCTGGTG 1350
CAGCCAGGGG GCTCACTCCG TTTGTCTGT GCAGTTTCTG GCTACTCCAT 1400
CACCTCCGA TACAGCTGGA ACTGGATCCG TCAGGCCCCG GGTAAGGGCC 1450
TGGAATGGGT TGCATCGATT ACGTATGACG GATCGACTAA CTATAACCCT 1500
ACCGTCAAGG GCCGTATCAC TATAAGTCGC GACGATTCCA AAAACACATT 1550
CTACCTGCAG ATGAACAGCC TGGTGCTGA GGACACTGCC GTCTATTATT 1600
GTGCTCGAGG CAGCCACTAT TTCGGTCACT GGCACCTCGC CGTGTGGGGT 1650

CAAGGAACCC TGGTCACCGT CTCCTCGGCC TCCACCAAGG GCCCATCGGT 1700
 CTCCCCCTA GCACCCTCCT CCAAGAGCAC CTCTGGGGG ACAGCGGCC 1750
 TGGGCTGCCT GGTCAAGGAC TACTTCCCCG AACCGGTGAC GGTGTCGTGG 1800
 AACTCAGGCG CCCTGACCAG CGGCGTGAC ACCTTCCCG CTGTCCTACA 1850
 GTCCTCAGGA CTCTACTCCC TCAGCAGCGT GGTGACCGTG CCCTCCAGCA 1900
 GCTTGGGCAC CCAGACCTAC ATCTGCAACG TGAATCACA GCCCAGCAAC 1950
 ACCAAGGTGG ACAAGAAAGT TGAGCCCAA TCTTGTGACA AAATCACAC 2000
 CTAGAGTGGC GGTGGCTCTG GTTCCGGTGA TTTTGATTAT GAAAAGATGG 2050
 CAAACGCTAA TAAGGGGGCT ATGACCGAAA ATGCCGATGA AAACGCGCTA 2100
 CAGTCTGACG CTAAAGGCAA ACTTGATTCT GTCGCTACTG ATTACGGTGC 2150
 TGCTATCGAT GGTTCATTG GTGACGTTT CGGCCTTGCT AATGGTAATG 2200
 GTGCTACTGG TGATTTTGCT GGCTCTAATT CCCAAATGGC TCAAGTCGGT 2250
 GACGGTGATA ATTCACCTTT AATGAATAAT TTCCGTCAAT ATTTACCTTC 2300
 CCTCCCTCAA TCGGTTGAAT GTCGCCCTTT TGTCTTAGC GCTGGTAAAC 2350
 CATATGAATT TTCTATTGAT TGTGACAAAA TAACTTATT CCGTGGTGTG 2400
 TTTGGGTTT TTTTATATGT TGCCACCTTT ATGTATGTAT TTTCTACGTT 2450
 TGCTAACATA CTGCGTAATA AGGAGTCTTA ATCATGCCAG TTCTTTTGGC 2500
 TAGCGCGGCC CTATACCTTG TCTGCCTCCC CGCGTTGCGT CGCGGTGCAT 2550
 GGAGCGGGG CACCTCGACC TGAATGGAAG CCGCGGCAC CTCGCTAACG 2600
 GATTCAACAC TCCAAGAATT GGAGCCAATC AATTCTTGCG GAGAACTGTG 2650
 AATGCGCAA CCAACCCTTG GCAGAACATA TCCATCGCGT CCGCCATCTC 2700
 CAGCAGCCG ACGCGGCGCA TCTCGGGCAG CGTTGGGTCC TGGCCACGGG 2750
 TCGCATGAT CGTGCTCCTG TCGTTGAGGA CCCGGCTAGG CTGGCGGGT 2800
 TGCCTTACTG GTTAGCAGAA TGAATCACCG ATACGCGAGC GAACGTGAAG 2850
 CGACTGCTGC TGAAAAACGT CTGCGACCTG AGCAACAACA TGAATGGTCT 2900
 TCGGTTTCCG TGTTTCGTAA AGTCTGGAAG CGCGGAAGTC AGCGCCCTGC 2950

ACCATTATCT TCCGGATCTG CATCGCAGGA TGCTGCTGGC TACCCTGTGG 3000
AACACCTACA TCTGTATTAA CGAAGCGCTG GCATTGACCC TGAGTGATTT 3050
TTCTCTGGTC CCGCCGCATG CATACCGCCA GTTGTTTACC CTCACAACGT 3100
TCCAGTAACC GGGCATGTTC ATCATCAGTA ACCCGTATCG TGAGCATCCT 3150
CTCTCGTTTC ATCGGTATCA TTACCCCAT GAACAGAAAT TCCCCCTTAC 3200
ACGGAGGCAT CAAGTGACCA AACAGGAAAA AACCGCCCTT AACATGGCCC 3250
GCTTTATCAG AAGCCAGACA TTAACGCTTC TGGAGAACT CAACGAGCTG 3300
GACGCGGATG AACAGGCAGA CATCTGTGAA TCGCTTCACG ACCACGCTGA 3350
TGAGCTTTAC CGCAGGATCC GGAAATTGTA AACGTTAATA TTTTGTTAAA 3400
ATTCGCGTTA AATTTTTGTT AAATCAGCTC ATTTTTTAAC CAATAGGCCG 3450
AAATCGGCAA AATCCCTTAT AAATCAAAAG AATAGACCGA GATAGGGTTG 3500
AGTGTGTTC CAGTTTGAA CAAGAGTCCA CTATTAAAGA ACGTGGACTC 3550
CAACGTCAA GGGCGAAAA CCGTCTATCA GGGCTATGGC CCACTACGTG 3600
AACCATCACC CTAATCAAGT TTTTGGGGT CGAGGTGCCG TAAAGCACTA 3650
AATCGGAACC CTAAAGGGAG CCCCCGATTT AGAGCTTGAC GGGGAAAGCC 3700
GGCGAACGTG GCGAGAAAGG AAGGAAGAA AGCGAAAGGA GCGGGCGCTA 3750
GGGCGCTGGC AAGGTAGCG GTCACGCTGC GCGTAACCAC CACACCGCC 3800
GCGCTTAATG CGCCGCTACA GGGCGGTCC GGATCCTGCC TCGCGGTTT 3850
CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA 3900
CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGCGCG 3950
TCAGCGGGTG TTGCCGGTG TCGGGCGCA GCCATGACCC AGTCACGTAG 4000
CGATAGCGGA GTGTATACTG GCTTAACTAT GCGGCATCAG AGCAGATTGT 4050
ACTGAGAGTG CACCATATGC GGTGTGAAAT ACCGCACAGA TCGGTAAGGA 4100
GAAAATACCG CATCAGGCGC TCTCCGCTT CCTCGCTCAC TGA CTGCTG 4150
CGCTCGGTG TTCGGCTGCG GCCAGCGGTA TCAGCTCACT CAAAGCGGGT 4200

AATACGGTTA TCCACAGAAT CAGGGGATAA CGCAGGAAAG AACATGTGAG 4250
 CAAAAGGCCA GCAAAAGGCC AGGAACCGTA AAAAGGCCGC GTTGCTGGCG 4300
 TTTTCCATA GGCTCCGCCC CCCTGACGAG CATCACAAA ATCGACGCTC 4350
 AAGTCAGAGG TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGGCGTTTC 4400
 CCCCTGGAAG CTCCCTCGTG CGCTCTCCTG TTCCGACCCT GCCGCTTACC 4450
 GGATACCTGT CCGCCTTTCT CCCTTCGGGA AGCGTGGCGC TTTCTCATAG 4500
 CTCACGCTGT AGGTATCTCA GTTCGGTGTA GGTCGTTTCG TCCAAGCTGG 4550
 GCTGTGTGCA CGAACCCCCC GTTCAGCCCG ACCGCTGCGC CTTATCCGGT 4600
 AACTATCGTC TTGAGTCCAA CCCGTAAGA CACGACTTAT CGCCACTGGC 4650
 AGCAGCCACT GGTAACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GCGGTGCTA 4700
 CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG CCTAACTACG GCTACACTAG AAGGACAGTA 4750
 TTTGGTATCT GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA AAAGAGTTGG 4800
 TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC AAACCACCGC TGGTAGCGGT GGTTTTTTTG 4850
 TTTGCAAGCA GCAGATTACG CGCAGAAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCCT 4900
 TTGATCTTTT CTACGGGGTC TGACGCTCAG TGAACGAAA ACTCACGTTA 4950
 AGGGATTTTG GTCATGAGAT TATCAAAAAG GATCTTCACC TAGATCCTTT 5000
 TAAATTAATA ATGAAGTTT AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAACT 5050
 TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT GAGGCACCTA TCTCAGCGAT 5100
 CTGTCTATTT CGTTCATCCA TAGTTGCCTG ACTCCCCGTC GTGTAGATAA 5150
 CTACGATACG GGAGGGCTTA CCATCTGGCC CCAGTGCTGC AATGATACCG 5200
 CGAGACCCAC GCTCACCAGC TCCAGATTTA TCAGCAATAA ACCAGCCAGC 5250
 CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCTCTG AACTTTATCC GCCTCCATCC 5300
 AGTCTATTAA TTGTTGCCGG GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT 5350
 AGTTTGCGCA ACGTTGTTGC CATTGCTGCA GGCATCGTGG TGTCACGCTC 5400
 GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TTCCCAACGA TCAAGGCGAG 5450
 TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAAG CGGTTAGCTC CTTGCGTCCT 5500

CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA GTGTTATCAC TCATGGTAT 5550
 GGCAGCACTG CATAATTCTC TTACTGTCAT GCCATCCGTA AGATGCTTTT 5600
 CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGCGG 5650
 CGACCGAGTT GCTCTTGCCC GCGGTCAACA CGGGATAATA CCGCGCCACA 5700
 TAGCAGAACT TTAAGAGTGC TCATCATTGG AAAACGTTCT TCGGGGCGAA 5750
 AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT GTAACCCACT 5800
 CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTCACCA GCGTTTCTGG 5850
 GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGGA ATAAGGGCGA 5900
 CACGGAAATG TTGAATACTC ATACTCTTCC TTTTCAATA TTATTGAAGC 5950
 ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA TACATATTG AATGTATTTA 6000
 GAAAAATAAA CAAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTTCCCGA AAAGTGCCAC 6050
 CTGACGTCTA AGAAACCATT ATTATCATGA CATTAACCTA TAAAAATAGG 6100
 CGTATCACGA GGCCTTTTCG TCITCAA 6127

(2)配列番号：2の情報：

(i)配列の性質：

(A)配列の長さ：121アミノ酸

(B)配列の型：アミノ酸

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列の記載：配列番号：2：

Asp	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser
1				5					10					15
Gln	Ser	Leu	Ser	Leu	Ala	Cys	Ser	Val	Thr	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr
				20					25					30
Ser	Gly	Tyr	Ser	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Phe	Pro	Gly	Asn	Lys
				35					40					45
Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Ser	Ile	Thr	Tyr	Asp	Gly	Ser	Ser	Asn	Tyr
				50					55					60
Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Asn	Arg	Ile	Ser	Val	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser
				65					70					75
Gln	Asn	Gln	Phe	Phe	Leu	Lys	Leu	Asn	Ser	Ala	Thr	Ala	Glu	Asp

	80		85		90									
Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Ser	His	Tyr	Phe	Gly	His
				95					100					105
Trp	His	Phe	Ala	Val	Trp	Gly	Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser
				110					115					120
Ser														
121														

(2)配列番号：3の情報：

(i)配列の性質：

(A)配列の長さ：121アミノ酸

(B)配列の型：アミノ酸

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列の記載：配列番号：3：

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5					10					15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr
			20						25					30
Ser	Gly	Tyr	Ser	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly
			35					40						45
Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Ser	Ile	Thr	Tyr	Asp	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr
			50					55						60
Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser
			65					70						75
Lys	Asn	Thr	Phe	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
			80					85						90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Ser	His	Tyr	Phe	Gly	His
			95					100						105
Trp	His	Phe	Ala	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser
			110					115						120
Ser														
121														

(2)配列番号：4の情報：

(i)配列の性質：

(A)配列の長さ：121アミノ酸

(B)配列の型：アミノ酸

(D)トポロジー：直鎖状

(x i)配列の記載：配列番号：4：

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	1	5	10	15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Xaa	20	25	30	
Ser	Asp	Tyr	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	35	40	45	
Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Val	Ile	Ser	Asn	Gly	Ser	Asp	Thr	Tyr	Tyr	50	55	60	
Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	65	70	75	
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	80	85	90	
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Ser	Arg	Phe	Phe	Xaa	Xaa	95	100	105	
Xaa	Xaa	Xaa	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	110	115	120	
Ser															121			

(2)配列番号：5の情報：

(i)配列の性質：

(A)配列の長さ：111アミノ酸

(B)配列の型：アミノ酸

(D)トポロジー：直鎖状

(x i)配列の記載：配列番号：5：

Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	1	5	10	15
Gly	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	20	25	30	
Tyr	Asp	Gly	Asp	Ser	Tyr	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	35	40	45	
Gln	Pro	Pro	Ile	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Tyr	Leu	Gly	Ser	50	55	60	
Glu	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	65	70	75	

Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Phe
 80 85 90

Tyr Cys Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly
 95 100 105

Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 110 111

(2)配列番号：6の情報：

(i)配列の性質：

(A)配列の長さ：1 1 1 アミノ酸

(B)配列の型：アミノ酸

(D)トポロジー：直鎖状

(x i)配列の記載：配列番号：6：

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp
 20 25 30

Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 35 40 45

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser
 50 55 60

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 65 70 75

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 80 85 90

Tyr Cys Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly
 95 100 105

Thr Lys Val Glu Ile Lys
 110 111

(2)配列番号：7の情報：

(i)配列の性質：

(A)配列の長さ：1 1 1 アミノ酸

(B)配列の型：アミノ酸

(D)トポロジー：直鎖状

(x i)配列の記載：配列番号：7：

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp

20	25	30
Ile Ser Xaa Xaa Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly		
35	40	45
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser		
50	55	60
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe		
65	70	75
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr		
80	85	90
Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly		
95	100	105
Thr Lys Val Glu Ile Lys		
110 111		

(2)配列番号：8の情報：

(i)配列の性質：

(A)配列の長さ：114アミノ酸

(B)配列の型：アミノ酸

(D)トポロジー：直鎖状

(x i)配列の記載：配列番号：8：

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val		
1	5	10
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Pro Val Asp		
20	25	30
Gly Glu Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly		
35	40	45
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser		
50	55	60
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe		
65	70	75
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr		
80	85	90
Tyr Cys Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly		
95	100	105
Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val		
110	114	

(2)配列番号：9の情報：

(i)配列の性質：

(A)配列の長さ：114アミノ酸

(B)配列の型：アミノ酸

(D)トポロジー：直鎖状

(x i)配列の記載：配列番号：9：

Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
1				5					10					15
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp
				20					25					30
Tyr	Glu	Gly	Asp	Ser	Tyr	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly
				35					40					45
Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Tyr	Leu	Glu	Ser
				50					55					60
Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
				65					70					75
Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr
				80					85					90
Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly
				95					100					105
Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val						
				110				114						

(2)配列番号：10の情報：

(i)配列の性質：

(A)配列の長さ：114アミノ酸

(B)配列の型：アミノ酸

(D)トポロジー：直鎖状

(x i)配列の記載：配列番号：10：

Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
1				5					10					15
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp
				20					25					30
Tyr	Asp	Gly	Asp	Ser	Tyr	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly
				35					40					45
Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Tyr	Leu	Glu	Ser
				50					55					60
Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe

	65		70		75									
Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr
				80					85					90
Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly
				95					100					105
Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val						
				110				114						

(2)配列番号：11の情報：

(i)配列の性質：

(A)配列の長さ：114アミノ酸

(B)配列の型：アミノ酸

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列の記載：配列番号：11：

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5					10					15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr
				20					25					30
Ser	Gly	Tyr	Ser	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly
				35					40					45
Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Ser	Ile	Lys	Tyr	Ser	Gly	Glu	Thr	Lys	Tyr
				50					55					60
Asn	Pro	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Ile	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser
				65					70					75
Lys	Asn	Thr	Phe	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
				80					85					90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Ser	His	Tyr	Phe	Gly	His
				95					100					105
Trp	His	Phe	Ala	Val	Trp	Gly	Gln	Gly						
				110				114						

(2)配列番号：12の情報：

(i)配列の性質：

(A)配列の長さ：114アミノ酸

(B)配列の型：アミノ酸

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列の記載：配列番号：12：

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5					10					15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr
 20 25 30
 Ser Gly Tyr Ser Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 35 40 45
 Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Thr Asn Tyr
 50 55 60
 Asn Pro Ser Val Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Phe Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His
 95 100 105
 Trp His Phe Ala Val Trp Gly Gln Gly
 110 114

(2)配列番号：13の情報：

(i)配列の性質：

(A)配列の長さ：218アミノ酸

(B)配列の型：アミノ酸

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列の記載：配列番号：13：

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp
 20 25 30
 Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 35 40 45
 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser
 50 55 60
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 65 70 75
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 80 85 90
 Tyr Cys Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly
 95 100 105
 Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe

110	115	120
Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser		
125	130	135
Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val		
140	145	150
Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu		
155	160	165
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
170	175	180
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val		
185	190	195
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr		
200	205	210
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
215	218	

(2)配列番号：14の情報：

(i)配列の性質：

(A)配列の長さ：451アミノ酸

(B)配列の型：アミノ酸

(D)トポロジー：直鎖状

(x i)配列の記載：配列番号：14：

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly		
1	5	10
15		
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr		
20	25	30
Ser Gly Tyr Ser Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly		
35	40	45
Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Thr Asn Tyr		
50	55	60
Asn Pro Ser Val Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser		
65	70	75
Lys Asn Thr Phe Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp		
80	85	90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His		
95	100	105

Trp His Phe Ala Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser	110	115	120
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser	125	130	135
Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val	140	145	150
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly	155	160	165
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser	170	175	180
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser	185	190	195
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro	200	205	210
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp	215	220	225
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly	230	235	240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu	245	250	255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val	260	265	270
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly	275	280	285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr	290	295	300
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln	305	310	315
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys	320	325	330
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly	335	340	345
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu	350	355	360

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 365 370 375
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 380 385 390
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 395 400 405
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 410 415 420
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 425 430 435
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 440 445 450
 Lys
 451

(2)配列番号：15の情報：

(i)配列の性質：

(A)配列の長さ：218アミノ酸

(B)配列の型：アミノ酸

(D)トポロジー：直鎖状

(x i)配列の記載：配列番号：15：

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Pro Val Asp
 20 25 30
 Gly Glu Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 35 40 45
 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser
 50 55 60
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 65 70 75
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 80 85 90
 Tyr Cys Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly
 95 100 105
 Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
 110 115 120

Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser
				125					130					135
Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val
				140					145					150
Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu
				155					160					165
Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser
				170					175					180
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val
				185					190					195
Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr
				200					205					210
Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys							
				215			218							

(2)配列番号：16の情報：

(i)配列の性質：

(A)配列の長さ：451アミノ酸

(B)配列の型：アミノ酸

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列の記載：配列番号：16：

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5						10				15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr
				20						25				30
Ser	Gly	Tyr	Ser	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly
				35					40					45
Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Ser	Ile	Thr	Tyr	Asp	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr
				50					55					60
Asn	Pro	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Ile	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser
				65					70					75
Lys	Asn	Thr	Phe	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
				80					85					90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Ser	His	Tyr	Phe	Gly	His
				95					100					105
Trp	His	Phe	Ala	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser

110					115					120				
Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser
				125					130					135
Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val
				140					145					150
Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly
				155					160					165
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser
				170					175					180
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
				185					190					195
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro
				200					205					210
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
				215					220					225
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
				230					235					240
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
				245					250					255
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
				260					265					270
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
				275					280					285
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr
				290					295					300
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln
				305					310					315
Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys
				320					325					330
Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
				335					340					345
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu
				350					355					360
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly

(2)配列番号：17の情報：

(A)配列の長さ：218アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

— 159 —

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 125 130 135

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
 140 145 150

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 155 160 165

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 170 175 180

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 185 190 195

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 200 205 210

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 215 218

(2)配列番号：18の情報：

(i)配列の性質：

(A)配列の長さ：451アミノ酸

(B)配列の型：アミノ酸

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列の記載：配列番号：18：

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr
 20 25 30

Ser Gly Tyr Ser Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 35 40 45

Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Lys Tyr Ser Gly Glu Thr Lys Tyr
 50 55 60

Asn Pro Ser Val Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
 65 70 75

Lys Asn Thr Phe Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His
 95 100 105

Trp His Phe Ala Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 110 115 120

Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	
				125					130					135	
Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	
				140					145					150	
Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	
				155					160					165	
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	
				170					175					180	
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	
				185					190					195	
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	
				200					205					210	
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	
				215					220					225	
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	
				230					235					240	
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	
				245					250					255	
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	
				260					265					270	
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	
				275					280					285	
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	
				290					295					300	
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	
				305					310					315	
Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	
				320					325					330	
Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	
				335					340					345	
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	
				350					355					360	
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	
				365					370					375	

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 380 385 390
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 395 400 405
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 410 415 420
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 425 430 435
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 440 445 450
 Lys
 451

(2)配列番号：19の情報：

(i)配列の性質：

(A)配列の長さ：218アミノ酸

(B)配列の型：アミノ酸

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列の記載：配列番号：19：

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Pro Val Asp
 20 25 30
 Gly Glu Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 35 40 45
 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser
 50 55 60
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 65 70 75
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 80 85 90
 Tyr Cys Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly
 95 100 105
 Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
 110 115 120
 Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser

125	130	135
Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val		
140	145	150
Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu		
155	160	165
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
170	175	180
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val		
185	190	195
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr		
200	205	210
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
215	218	

(2)配列番号：20の情報：

(i)配列の性質：

(A)配列の長さ：229アミノ酸

(B)配列の型：アミノ酸

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列の記載：配列番号：20：

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly		
1	5	10
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr		
20	25	30
Ser Gly Tyr Ser Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly		
35	40	45
Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Thr Asn Tyr		
50	55	60
Asn Pro Ser Val Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser		
65	70	75
Lys Asn Thr Phe Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp		
80	85	90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His		
95	100	105
Trp His Phe Ala Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser		
110	115	120

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 125 130 135
 Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 140 145 150
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 155 160 165
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 170 175 180
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 185 190 195
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 200 205 210
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 215 220 225
 Lys Thr His Thr
 229

(2)配列番号：21の情報：

(i)配列の性質：

(A)配列の長さ：229アミノ酸

(B)配列の型：アミノ酸

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列の記載：配列番号：21：

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr
 20 25 30
 Ser Gly Tyr Ser Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 35 40 45
 Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Lys Tyr Ser Gly Glu Thr Lys Tyr
 50 55 60
 Asn Pro Ser Val Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Phe Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His
 95 100 105

Trp His Phe Ala Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 110 115 120
 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 125 130 135
 Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 140 145 150
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 155 160 165
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 170 175 180
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 185 190 195
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 200 205 210
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 215 220 225
 Lys Thr His Thr
 229

(2)配列番号：22の情報：

(i)配列の性質：

(A)配列の長さ：248アミノ酸

(B)配列の型：アミノ酸

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列の記載：配列番号：22：

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr
 20 25 30
 Ser Gly Tyr Ser Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 35 40 45
 Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Thr Asn Tyr
 50 55 60
 Asn Pro Ser Val Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Phe Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr
 20 25 30
 Ser Gly Tyr Ser Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 35 40 45

Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Ser	Ile	Lys	Tyr	Ser	Gly	Glu	Thr	Lys	Tyr	50	55	60
Asn	Pro	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Ile	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	65	70	75
Lys	Asn	Thr	Phe	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	80	85	90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Ser	His	Tyr	Phe	Gly	His	95	100	105
Trp	His	Phe	Ala	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	110	115	120
Ser	Glu	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Gly	Gly	Gly	125	130	135
Ser	Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	140	145	150
Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Lys	Pro	Val	155	160	165
Asp	Gly	Glu	Gly	Asp	Ser	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	170	175	180
Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Tyr	Leu	Glu	185	190	195
Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	200	205	210
Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	215	220	225
Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	230	235	240
Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg								245	248	

(2)配列番号：24の情報：

(i)配列の性質：

(A)配列の長さ：218アミノ酸

(B)配列の型：アミノ酸

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列の記載：配列番号：24：

Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	1	5	10	15
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	---	----	----

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Pro Val Asp	20	25	30
Gly Glu Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly	35	40	45
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser	50	55	60
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	65	70	75
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr	80	85	90
Tyr Cys Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly	95	100	105
Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe	110	115	120
Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser	125	130	135
Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val	140	145	150
Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu	155	160	165
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser	170	175	180
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val	185	190	195
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr	200	205	210
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	215	218	

(2)配列番号：25の情報：

(i)配列の性質：

(A)配列の長さ：233アミノ酸

(B)配列の型：アミノ酸

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列の記載：配列番号：25：

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

1	5	10	15
Gly Ser Leu Arg	Leu Ser Cys Ala Val	Ser Gly Tyr Ser Ile Thr	
20		25	30
Ser Gly Tyr Ser	Trp Asn Trp Ile Arg	Gln Ala Pro Gly Lys Gly	
35		40	45
Leu Glu Trp Val	Ala Ser Ile Thr Tyr	Asp Gly Ser Thr Asn Tyr	
50		55	60
Asn Pro Ser Val	Lys Gly Arg Ile Thr	Ile Ser Arg Asp Asp Ser	
65		70	75
Lys Asn Thr Phe	Tyr Leu Gln Met Asn	Ser Leu Arg Ala Glu Asp	
80		85	90
Thr Ala Val Tyr	Tyr Cys Ala Arg Gly	Ser His Tyr Phe Gly His	
95		100	105
Trp His Phe Ala	Val Trp Gly Gln Gly	Thr Leu Val Thr Val Ser	
110		115	120
Ser Ala Ser Thr	Lys Gly Pro Ser Val	Phe Pro Leu Ala Pro Ser	
125		130	135
Ser Lys Ser Thr	Ser Gly Gly Thr Ala	Ala Leu Gly Cys Leu Val	
140		145	150
Lys Asp Tyr Phe	Pro Glu Pro Val Thr	Val Ser Trp Asn Ser Gly	
155		160	165
Ala Leu Thr Ser	Gly Val His Thr Phe	Pro Ala Val Leu Gln Ser	
170		175	180
Ser Gly Leu Tyr	Ser Leu Ser Ser Val	Val Thr Val Pro Ser Ser	
185		190	195
Ser Leu Gly Thr	Gln Thr Tyr Ile Cys	Asn Val Asn His Lys Pro	
200		205	210
Ser Asn Thr Lys	Val Asp Lys Lys Val	Glu Pro Lys Ser Cys Asp	
215		220	225
Lys Thr His Thr	Cys Pro Pro Cys		
230		233	

(2)配列番号：26の情報：

(i)配列の性質：

(A)配列の長さ：233アミノ酸

(B)配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状
(x i) 配列の記載：配列番号：26：

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	1	5	10	15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	20	25	30	
Ser	Gly	Tyr	Ser	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	35	40	45	
Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Ser	Ile	Lys	Tyr	Ser	Gly	Glu	Thr	Lys	Tyr	50	55	60	
Asn	Pro	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Ile	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	65	70	75	
Lys	Asn	Thr	Phe	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	80	85	90	
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Ser	His	Tyr	Phe	Gly	His	95	100	105	
Trp	His	Phe	Ala	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	110	115	120	
Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	125	130	135	
Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	140	145	150	
Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	155	160	165	
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	170	175	180	
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	185	190	195	
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	200	205	210	
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	215	220	225	
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys								230	233		

【図1】

マウスMaE11、F(ab)-2のアミノ酸配列及び重鎖サブグループIII
(humIII)と軽鎖κサブグループI(humkI)のヒトコンセンサス配列

VHドメイン					
	10	20	30	40	
MaE11	DVQLQESGPG * * *	LVKPSQSLSL * * *	ACSVTGYSITS * * *	[GYSWN]WIRQF *	
F(ab)-2	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAVSGYSITS * * * * *	[GYSWN]WIRQA * * * *	
humIII	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGTFE-S	[DYAMS]WVRQA	
	49	60	70	80	
MaE11	PGNKLEWMG ** **	[SITYDGSSNYN PSLKN]RISVT * * * * *		RDTSONQFFL * * * * *	
F(ab)-2	PGKGLEWVA	[SITYDGSTNYA DSVKG]RFTIS * * * * *		RDDSKNTFYL	
humIII	PGKGLEWVA	[VISNGSDTYA DSVKG]RFTIS		RDDSKNTLYL	
	82abc	90	100abcd	103	113
MaE11	KLNSATAEDTATY ** ** *		YCAR[GSHYFGHWHEAV] * *	WGAGTTVT	VSS
F(ab)-2	QMNSLRAEDTAVY		YCAR[GSHYFGHWHEAV] * * * * *	WGQGTLLVT	VSS
humIII	QMNSLRAEDTAVY		YCAR[DSRFE-----DV]	WGQGTLLVT	VSS

VLドメイン					
	10	20	30	32abcd	40
MaE11	DIQLTQSPAS *	LAVSLGQRAT * * * * *	ISC[KASQSVYDYGDSYMN] * *		WYQOKP
F(ab)-2	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITC[RASQSVYDYGDSYMN] * * * * *		WYQOKP
humk1	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITC[RASQSVYDYGDSYMN] * * * * *		WYQOKP
	49	60	70	80	
MaE11	GQPPILLIY * * *	[AASYLGS]EIPA * * *	RFGSGSGGTD	FTLNIHPVEE * * * * *	
F(ab)-2	GKAPKLLIY	[AASYLES]GVPS *	RFGSGSGGTD	FTLTISLQP	
humk1	GKAPKLLIY	[AASSLES]GVPS	RFGSGSGGTD	FTLTISLQP	
	88	97	107		
MaE11	EDAATFYC * *	[QQSHEDPYT] *	FGAGTKLEIK *		
F(ab)-2	EDFATYYC	[QQSHEDPYT] * * * *	FGQGTKVEIK		
humk1	EDFATYYC	[QQYNSLPYT]	FGQGTKVEIK		

Figure 1

【図2】

抗 I g e 変異体

	10	20	30	40
e27	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASKPVD	GEGDSYMNWY
e26	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASKPVD	GEGDSYMNWY
e426	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASOSVD	YEGDSYMNWY
e25	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASOSVD	YDGD SYMNWY
	CDR-L1			
	50	60	70	80
e27	QQKPGKAPKL	LIYAASYLE	GVPSRFSGSG	SGTDFTLTIS
e26	QQKPGKAPKL	LIYAASYLE	GVPSRFSGSG	SGTDFTLTIS
e426	QQKPGKAPKL	LIYAASYLE	GVPSRFSGSG	SGTDFTLTIS
e25	QQKPGKAPKL	LIYAASYLE	GVPSRFSGSG	SGTDFTLTIS
	CDR-L2			
	90	100	110	
e27	SLQPEDFATY	YCOOSHEDPY	TFGQGTKVEI	KRTV
e26	SLQPEDFATY	YCOOSHEDPY	TFGQGTKVEI	KRTV
e426	SLQPEDFATY	YCOOSHEDPY	TFGQGTKVEI	KRTV
e25	SLQPEDFATY	YCOOSHEDPY	TFGQGTKVEI	KRTV
	CDR-L3			
	10	20	30	40
e27	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAVSGYSIT	SGYSWNWIRQ
e26	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAVSGYSIT	SGYSWNWIRQ
e426	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAVSGYSIT	SGYSWNWIRQ
e25	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAVSGYSIT	SGYSWNWIRQ
	CDR-H1			
	50	60	70	80
e27	APGKGLEWVA	SIKYSGETKY	NPSVKGRITI	SRDDSKNTFY
e26	APGKGLEWVA	SITYDGSTNY	NPSVKGRITI	SRDDSKNTFY
e426	APGKGLEWVA	SITYDGSTNY	NPSVKGRITI	SRDDSKNTFY
e25	APGKGLEWVA	SITYDGSTNY	NPSVKGRITI	SRDDSKNTFY
	CDR-H2			
	90	100	110	
e27	LQMNSLRAED	TAVYYCARGS	HYFGHWHEAV	WGQG
e26	LQMNSLRAED	TAVYYCARGS	HYFGHWHEAV	WGQG
e426	LQMNSLRAED	TAVYYCARGS	HYFGHWHEAV	WGQG
e25	LQMNSLRAED	TAVYYCARGS	HYFGHWHEAV	WGQG
	CDR-H3			

Figure 2

【図3】

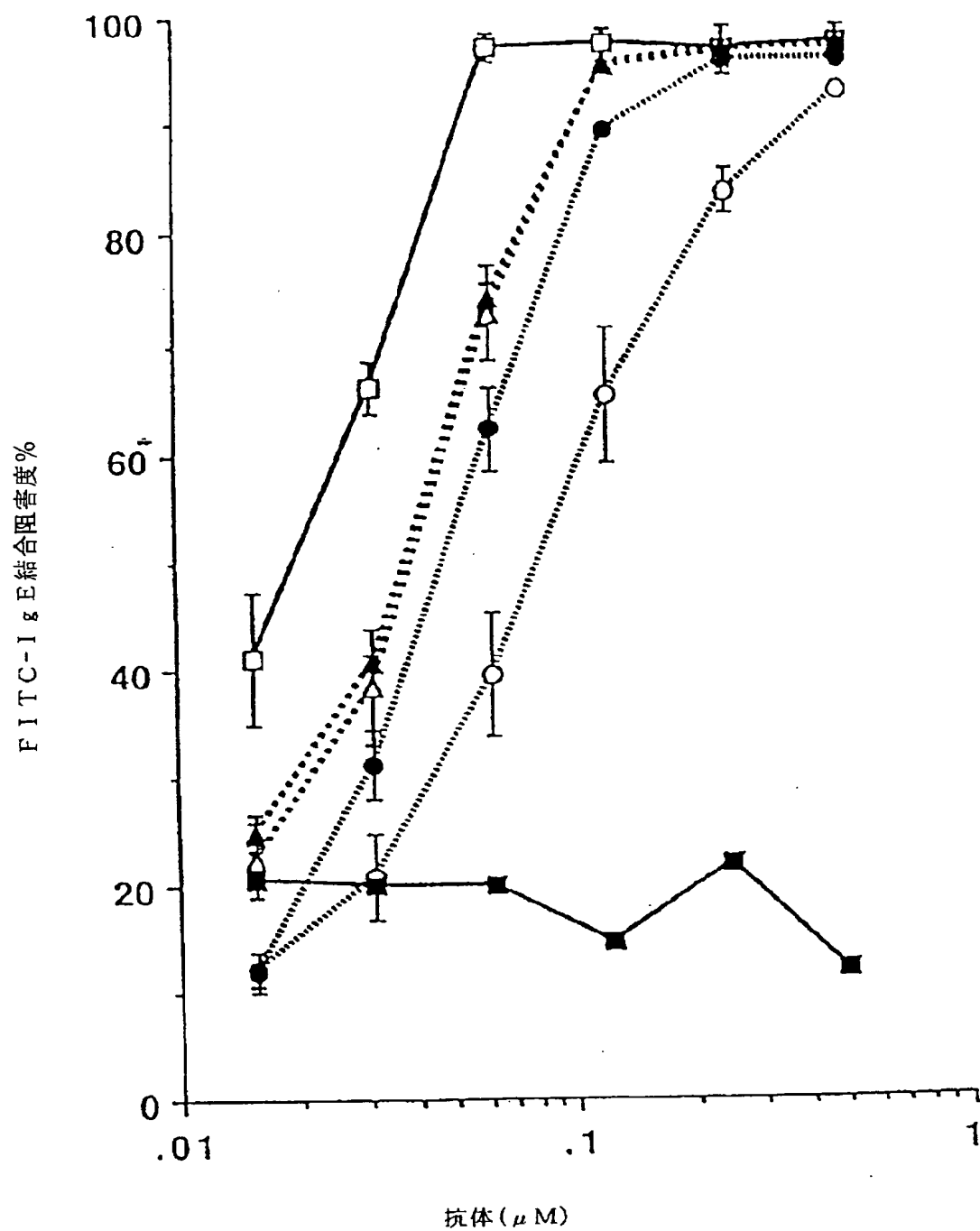


Figure 3

【図4】

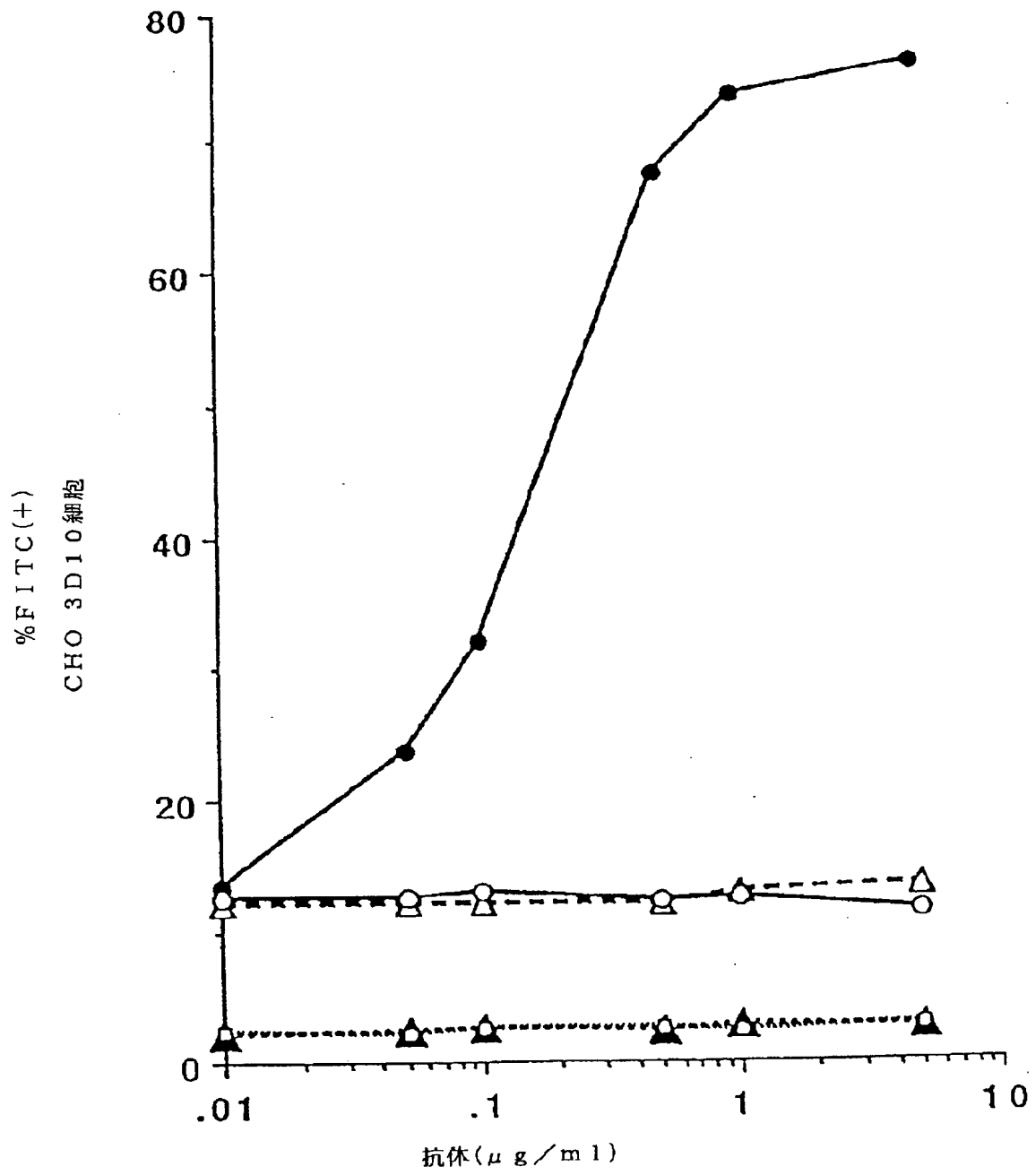


Figure 4

【図5】

ヒスタミン放出アッセイ

- e 2 5 又は e 2 6 の F a b 型

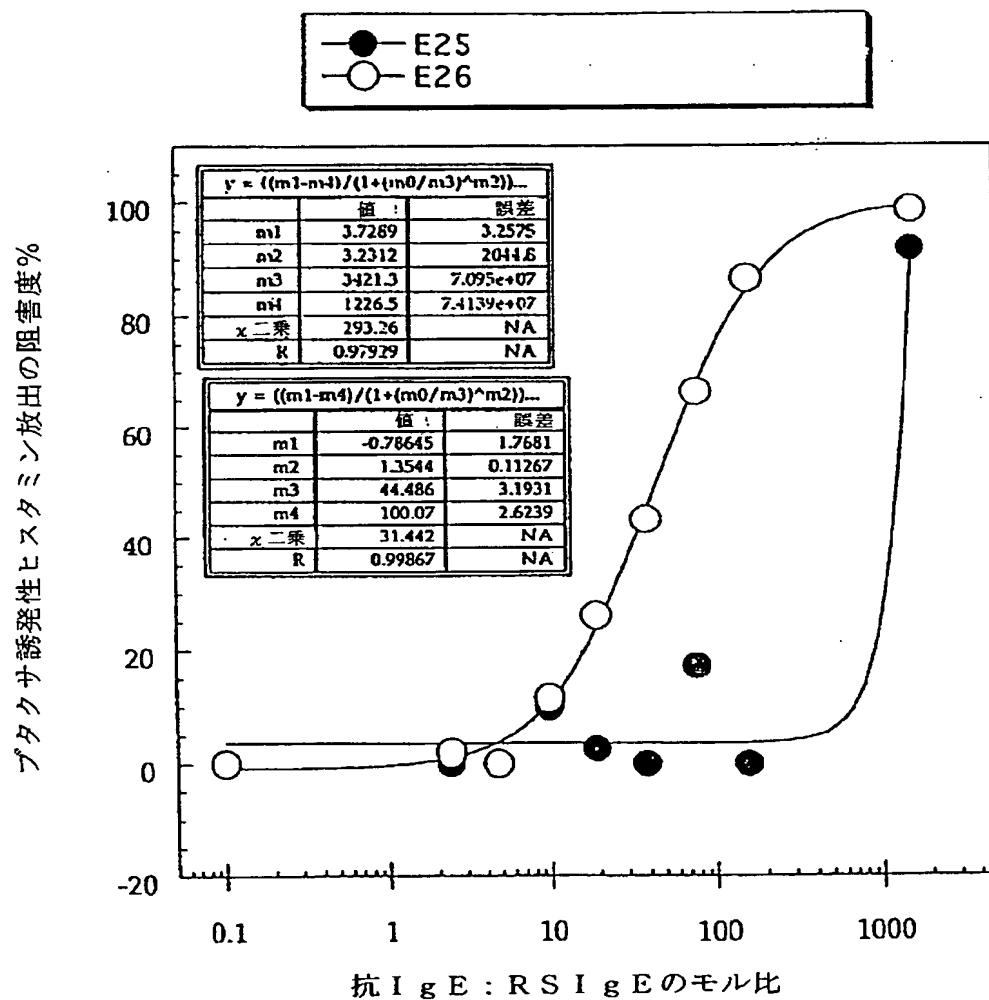


Figure 5

【図6】

ファージ濃縮

- ライブラリ: a, b in VL1; c, d in VH3
- 6ラウンドの選択
- 全てがe426を越える濃縮化を示した

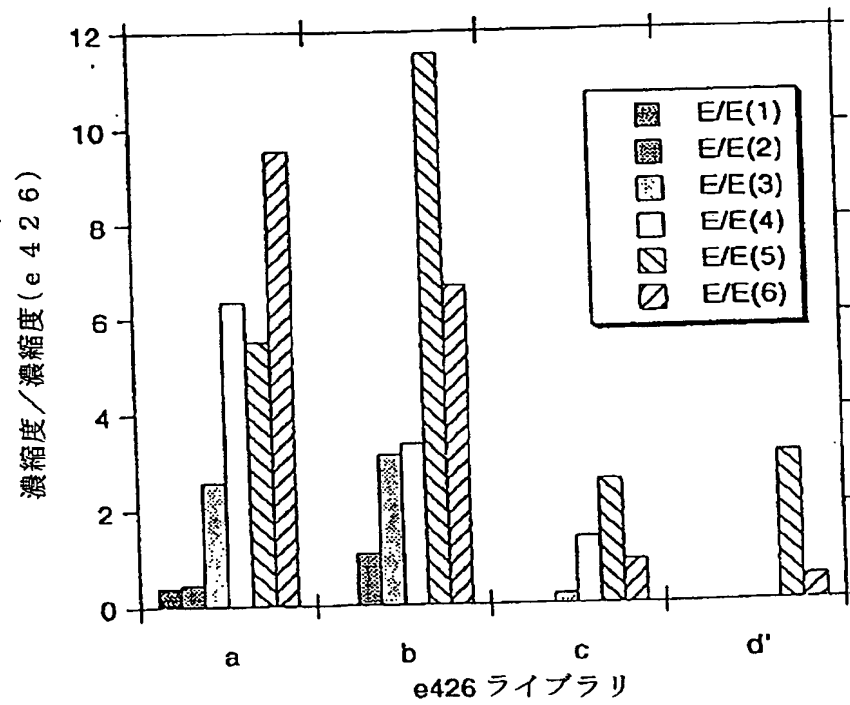


Figure 6

【図7】

ファージELISA競合アッセイ

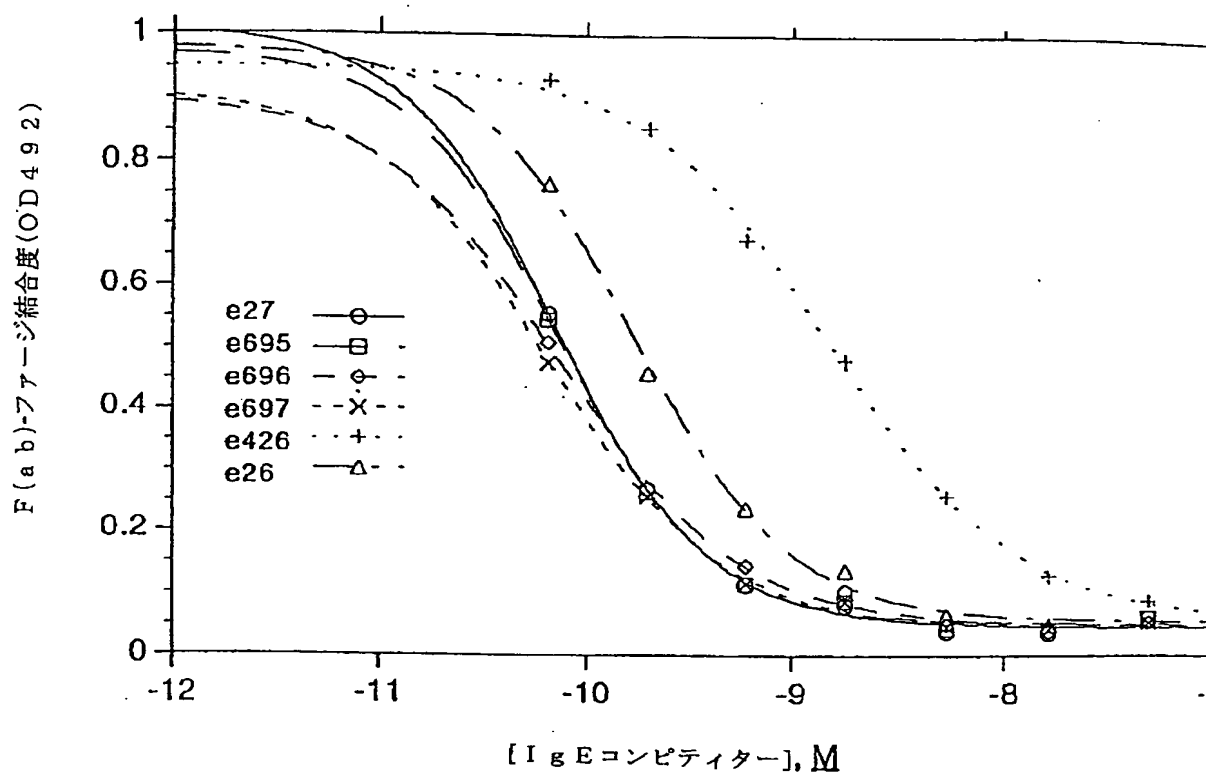


Figure 7

【図8】

抗IgE Fabによりコートされた10.5 nMの
FcERI α -IgGへのビオチン標識IgE結合の阻害度

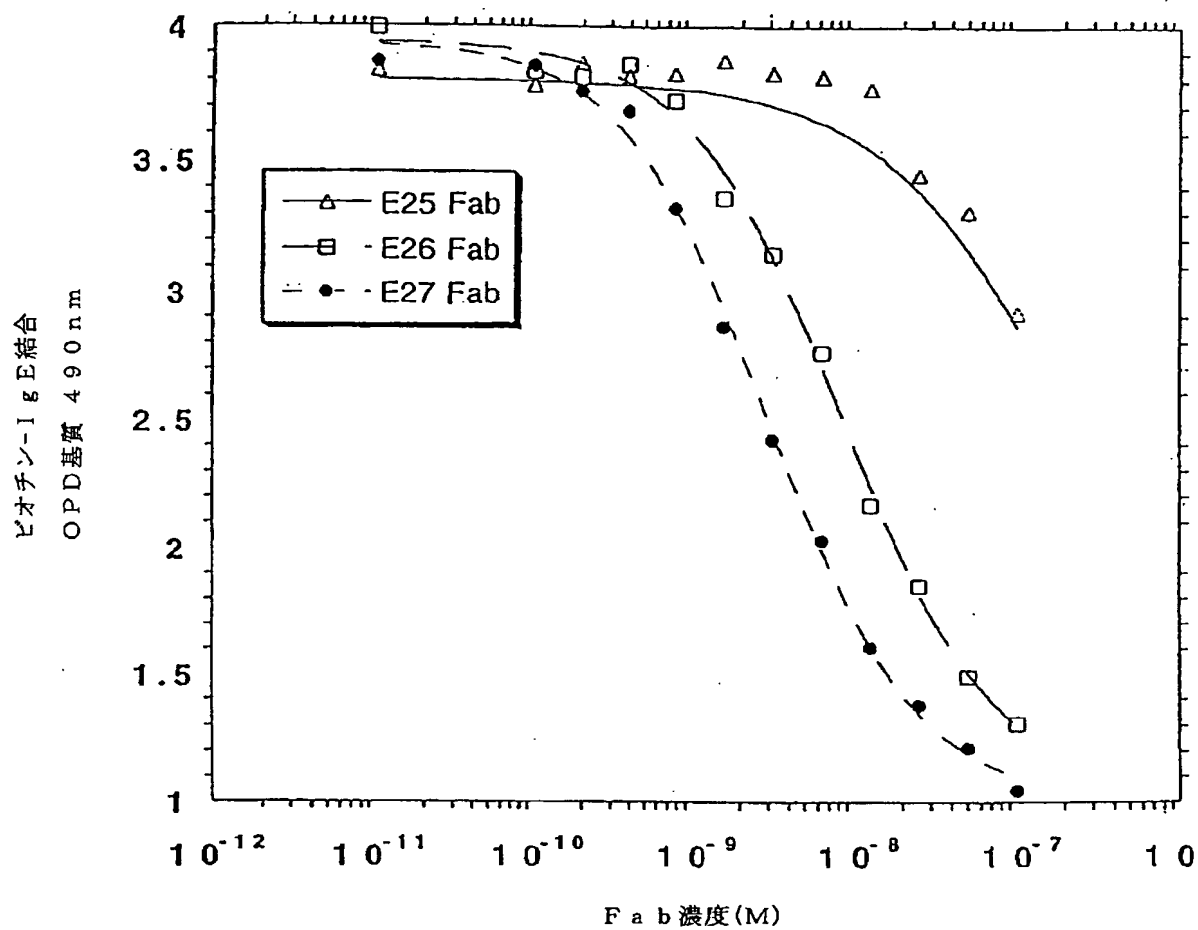


Figure 8

【図9】

F a bの見かけの結合親和性(B I Aコア)

条件：固定化 I g E ；

200 nMのF a bと1.5 x連続希釈物

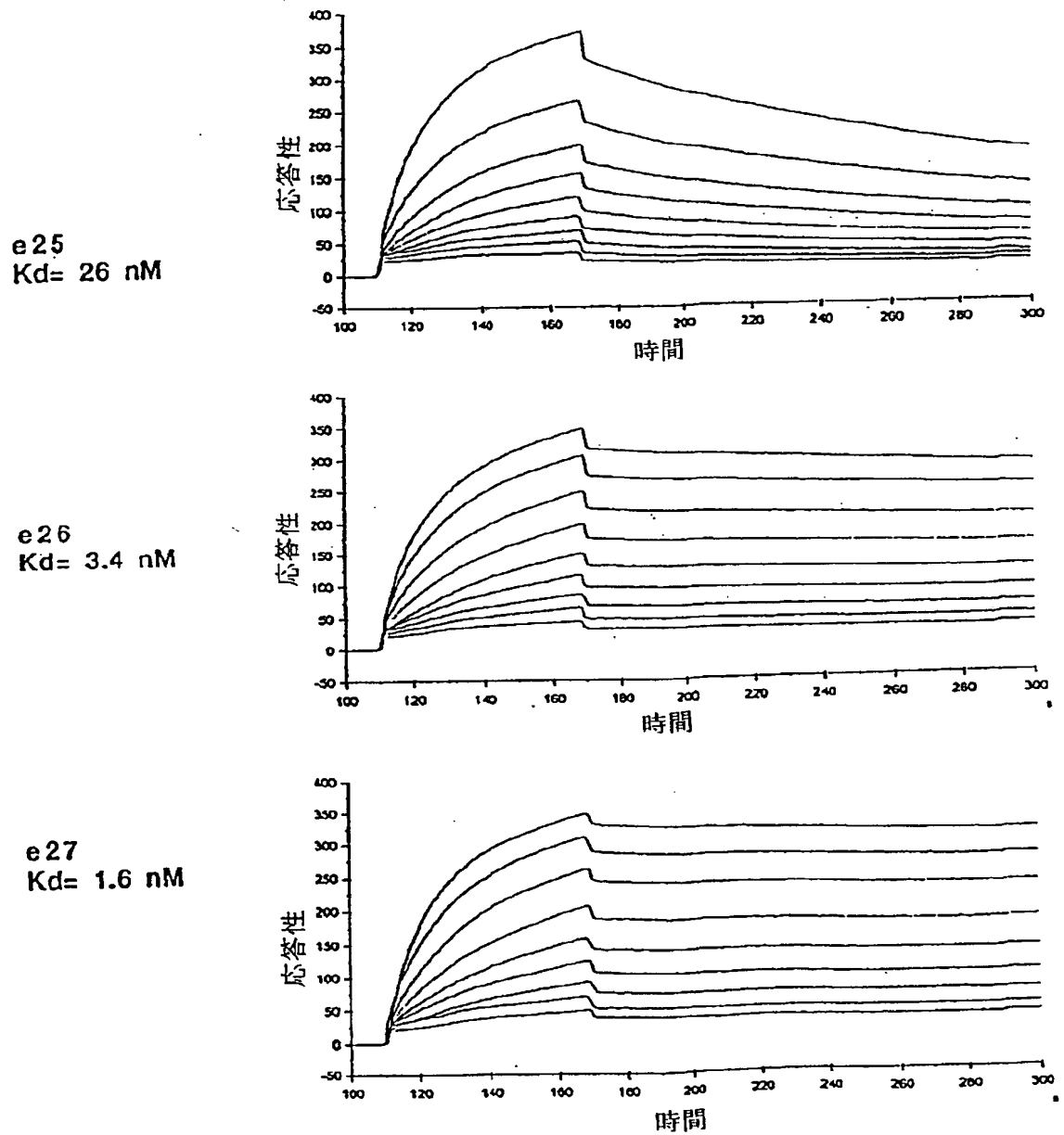


Figure 9

1 GAATTCACCT TCTCCACTACT TTGGATAAGG AATATCAAGC ATGAAATTC TCATTCTGTA GTTGT...TTT AAGCTTGCCC AAAAAGAGAG AGAGTGGAT
CTTAAGTTGA AGAGGTATGA AACTATATCC TTATGTCTG TACTTTTNG AGTAAAGACT CAAACAATATA TTGAAACGGG TTTTCTTCT TCTCAGCTTA

101 GAAGTGTGTG CGCAGGTAGA AGCTTTGGAG ATTATCGTCA CTGCAATGCT TCGCAATATG GCGCAATATG ACCAACAAGG GTTGATTGAT CAGGTAGAGG
CTTGACACAC GCGTCCACTCT TCGAAACCTC TAAATAGCACT GAGCTTACCA AGCGTTATAC CCGCTTTAC TGGTGTCCG CAAGTACTA GTCCATCTCC

201 GGGCGCTGTA CGAGGTAAAG CCCGATGCCA GCATTCTGTA CGAGATAGG GAGCTGTCCG GCGATTACGT AAAGAAGTGA TTGAAGCATC CTCGTCACTA
CCCGCGACAT GCTCCATTTC GGGGTACGGT CGTAAAGACT GCTGCTATCC CTCGACGACG CGCTAATGCA TTTCTTCAT AACTTCGTAG GAGCAGTCAAT

301 AAAAGTTAAT CTTTCAACA GCTGTCAATTA AGTTGTACAG GCGGAGACTT ATATGCGCTT TGTTTTAT TTTTAATGTA TTTGTAACTA GAATTCAGAC
TTTCAATTA GAAAAGTTGT CGACAGTAT TCAACAGTCC CGGCTCTGAA TATCAGCGAA ACAAAATTA AAAATTACAT AACATTGAT CTAAAGCTCG

401 TCGGTACCCG GGGATCCCTCT CGAGGTGAG GTGATTTTAT GAAAAGAAAT ATGCAATTTC TTCTTGATC TATGTTGCT TTTCTATTG CTACAAAGCC
AGCCATGGGC CCTTAGAGAG GCTCCAACTC CACTAAATA CTTTTCTTA TACGTTAAG AAGAACGTAG ATACAGGAA AAAAGATTAAC GATGTTCCG

501 GTACGCTGAT ATCCAGCTGA CCCAGTCCC GAGCTCCCTG TCGGCTCTG TGGGCGATAG GGTCAACATC ACCTGCCGTG CCAATCAAGG CGTCAATTAC
CATGCGACTA TAGGTGACT GGGTCAGGGG CTCGAGGAGC AGGCGAGAGC ACCGCTATC CCAATGCTAG TGGACGGCAC GGTCAAGTCTC GCACTAATG

1 Alaasp IleIleIleut hrgIleSerIpr oseSerIeu SerIleSerV alGlyAspAr gValThrIle ThrIyAlrpa IasergIse rValAspIyr
氨基酸の並び

601 GAAGGTGATA GCTACCTGAA CTGGTATCAA CAGAACCAG GAAAAGCTCC GAACTACTG ATTTAGCGGG CCTCGTACTT GAGTCTGda GTCCTCTCTC
CTTCCACTAT CGATGACTT GACCATAGTT GTCTTTGGTC CTTTTCAGG CTTGATGAC TAAATGCGCC GAGCATAGA CCTCAGACT CAGGGAAGAG

33 GluGlyAsps erTyrLeuAs nTprTyrGln GluIysProg IyIyAlaIpr olyIleuIeu IleTyrAlaIa IasertYrIe uGluSerGly ValProseArIg

701 GCTTCTCTGG ATCCGCTCTT GGGAGGAGAT TCACTCTGAC CATCAGCAAT CTGACGCCAG AAGACTTCGC AACTTATTTAC TGTCAAGCAA GTTCAGAGGA
CGAAGAGACC TAGGCCAAGA CCTGCGCTTA AGTGAAGCTG GATGCTGCTA GAGCTCGGTC TTCTGAAGCG TTGAATATAG ACAATATAG ACAATCTCTT CAGTCTCTT

67 PheSerGI ySerGlySer GlyThrAspP heThrIleuTh rIleSerSer LeuGlnProg IAspPheAl ethrTyrIyr cysGlnGlns erIleGIAsp

801 TCCGTACACA TTGGACAGG GTACCAAGT GGAATTCAAA CGAACTGTG CTGCAACATC TGTCTTCATC TTCCGGCCAT CTGATGAGA GTTGAATCT
AGGCATGTGT AAACCTGTCC CATGTTCCA CCTTAGTTT GCTTACACCC GACGTGTTAG ACAAGATAG AAGGGCGGTA GACTACTGCT CACTTTAGA

100 ProTyrThr PheGlyGlnG IyThrIySva IgluIleIys ArgThrVala IalaIProse rValPheIle PheProProS erAspGlucl nIeulYsSer

901 GGAAGTGCCTT CTGTGTGTG CTGCTGCAAT AACTTCTATC CCAAGAGAGC CAAAGTACAG TGGAGGTG AGTAAGCCCT CCAATCGGGT AACTCCACAG
CCTTGACGAA GACAACACAC GAGACGCTTA TTGAAGATAG GGTCTCTCCG GTTTCATGTC ACCTTCACC TATGCGGGA GTTAAGCCA TTGAAGGTCC

133 GlyThrAlas erValValcy sleuIeuAsn AsnPhetYrP roArgIuAl alIyValGln TrpIySvala spAsnAlale uGlnSerGly AsnSerGlnIu

101

Figure 10 A

1001 AGAGTGTAC AGAGCAGGAC AGCAAGAGCA GACACTAGG CCTCAGAGC ACCCTAGGC TGAGCAAGC AGACTACGAG AACACAAAG TCTAGCCTG
TCTCAGAGT TCTGCTCTG TCGTTCCTGT CGTAGATGTC GAGGTGCTCG TGAGCTCGG ACTCGTTCC TCTGATGCTC TTTGTGTTTC AGATGGGAGC
167 SerValTh rGlulnAsp SerLybAsp eThrtYse rLeuSerSer ThrlenthL euserLyval aApTyrglu LybHlelysv alTyrlAcys
1101 CGAAGTCACC CATCAGGGCC TGAGCTCGC CGTCACAAAG AGCTTCACAA GGGGAGAGTG TTAGCTGAT CCTTCAGCC GGACGCATCG TGCCCCTAGT
GCTTCAGTGG GTAGTCCCCG ACTGAGCCG GACGTGTTT TCGAAGTGT CCTCTCAC AATTGACTA GGAGATGCGG CTTGCTAGC ACCGGATCA
200 GluValThr HAsglndlyL euserSerPr oValThrLyS SerbAsna rGelyalucy soc*
1201 ACGCAAGTTC ACGTAAAAAG GGTATCTAGA GGTTAGAGTG ATTATTAGA AAAGATATC GCATTCTTC TTGCATCTAT TTGATCTAT GTTCGTTT TCTATTGCTA
TGCCTTCAG TGCATTTTTC CCATAGATCT CCACTCCAC TAAATACTT TTTCTATAG GGTAAAGAG AACGTAGATA CAAGCAAAA AGATACGAT
1301 CAACAGCGTA CGCTAGGTT CAGCTAGTGG AGTCTGGCG TGCCCTGCTG CAGCAAGGGG GCTCACTCG TTTGTCTGT GCAATTCTG GCTACTGCA
GTTTCGCGAT GCGACTCCAA GTCAACCAAC TCAGACCGCC ACCGAGCAC GTGCTGCC CAGGTGAGC AACACAGCA CGTCMAAGAC CGATGAGTA
1 GluVal GlndeuValG luserlygl yGlyeuVal GlndProglyG lSerleuAr gluserCyS AlavalSerG lyTySerile
1401 CACCTCCGGA TACAGCTGA ACTGATCCG TCAGGCCCGG GGTAAAGGCC TGAGATGGGT TGCAATCAIT ACGTATAGC GATGACTAA CTATAACCT
GTGAGAGCCT ATGTGACCT TGACCTAGGC AGTCCGGGG CCATTCGGG ACCTTACCA ACCTAGCTTA TGCACTAGC CTAGCTGAT GATATAGGA
30 Thsergly TySerTrp antTrpIleAr glndAlPro GlylyblyL euglutrPyA lAlaserile ThrtYAspG lySerThyAs nTyraSnPro
1501 AGCGTCMAGG GCGGTATCAC TATTAAGTCC GACGATCCA AAACACACT CTACCTGCAG ATGACMAGC TGCGTCTGA GACACTGCC GTCTATTAT
TCGCAATTCC CGGCTAGTG ATATCAGCG CTGCTAAGT TTTGTGTATA GATGAGCTC TACTGTGG AGGCAGACT CCTGTAGCG CAGATATTA
63 SerVallyag LyArgIleTh rLleSerArG AspAspSerL yAsnThrPh eTyLeuGlN MetAsnSerL euLyAlagI uApThzAla ValTyTyCyS
1601 GTGCTCAGG CAGCACTAT TTGCTCACT GGCATTCCG CGTGGGGGT CAGGAAACC TGATCAACGT CTCTCGGCC TCACACAAAG GCCCATCGGT
CACAGCTCC GTCGGTGATA AAGCCAGTA CCGTGAAGG GCACACCCA GTTCCTTGG ACCAGTGA GAAGAACCGG AGGTGTTCC GGGTAGCA
97 AlaArgl ySerHstYr PhelYHst rPhlPheAl aValTrpGly GlndlyThL euValThyA lSerSerAla SerThrlYag lyProSerVal
1701 CTTCCTCCCTA GCACCTCTCT CCAAGAGAC CTCTGGGGG ACAGCGGCC TGCGTGGCT GATCAAGAC TACTTCCCG AACCGTAC GGTGTCTG
GAAGGGGAT CGTGGAGGA GGTTCCTGT GAGACCCCG TGTGCGGG ACCGACGGA CCACTCTG ATGAAGGG TTAGCCACTG CCAAGACAC
130 PheProLeu AlaproSerS eLySerTh rSerlyGly ThrAlalal euGlyCyale uVallybAsp TyrPhePro luproValTh rValSerTrp
1801 AACTCAGGCG CCTGACAGC GGGGTGAC ACCTTCCCG CTGTCTACA GTCTCAGA CTCTACTCC TCAGCAGCGT GGTGACGNG CCTTCACGA
TTGATCTCCG GGAATGCTC GCCGCACTG TGGAAGGCC GACAGATGT CAGATCTCT GAGATGAGG AGTGTGCA CCACTGGCAC GGAAGTCT
163 AsnSerGlyA lalenthse rGlyValHls ThrlphePro lavalauGl nSerSerly LeuTySerL euserSerVa lValThVal ProSerSerSer

【 1 0 】

Figure 10 B

1901 GCTTGGGCAC CCAGACCTAC ATCTGCACAG TGAATCACA GCCCAGCAGC ACCAGCTGG ACAAGAACT TGAAGCCCAA TCTTGTGACA AACTGCACAC
CGAACCCGTG GGTCTGGATG TAGACCTTGC ACTTAGTCTT CCGGTCCGTG TGGTCCACG TGTCTTTCA ACTCGGCTT AGAACACTGT TTTGAGTGTG
197 LeuGlyTh rGlnThrTyr IleCysAsnV alaAsnHisIly sProSerAsn ThrIlyVala sPlyLeysVa lGluProLys SerCysAspL ySThrHisThr
重組のホリ
2001 CTAGAGTGC GGTGGCTCNG GTTCCGGTGA TTTTGATTAAT GAAAGATGG CAAGCCTTA TAAAGGGCT ATGAGCCGAA ATGCCGATGA AAAGCGCTA
GATCTCACCG CCACCGAGAC CAAGGCCACT AAACCTAATA CTTTCTCAC GTTTCGCAAT ATTCCCCGA TACTGGCTTT TACGGCTACT TTTCCCGCAT
230 Am*SerGly GlyGlySerG lySerGlyAs pPheAspTyr GlulysMetA laAsnAlaAs nLysGlyAla MetThrIluA snAlaAspEl uAsnAlaLeu
83pC末端ドメインへの融合
2101 CAGTCTGACG CTAAAGGCA ACTGATTTCT GTCCCTACTG ATTACGGTGC TGTATGCAAT GGTTCATNG GTGACGTTTC CCGCTTGCCT AATGCTATG
GTCCAGACTGC GATTTCCGTT TGAATTAAGA CAGGATGAC TAATGCCAG AGCATAGCTA CCAAGTAAAC CACTGCANAAG GCCGAAAGCA TTAACATTAC
263 GlnSerAspA lAllysGlyLy sLeuAspSer valAlaThrA sPlyrGlyAl aAlaIleAsp GlyPheIleG lYAspValSe rGlyLeuAla AsnGlyAsnGly
2201 GTGCTACTGC TGAATTTGCT GGCCTTAAT CCCAATGAC TCAAGTCCGT GACGGTGATA ATTCACTTT AATGAATAT TCCCGTCAAT ATTACCTTC
CACGATGACC ACTAAAGCA CCGAGATTAA GGGTTTACC AGTTCAAGCA CTGCCACTAT TAAGTGAAA TTAAGTAAATA AAGGACAGTTA TAAATGGAAG
297 AlaThrGl yAspPheAla GlySerAsnS erGlnMetAl aGlnValGly AspGlyAspA snSerProLe uMetAsnAsn PheArgGlnT yrLeuProSer
2301 CCTCCCTCAA TCGGTTGAAT GTCCGCCCTT TGTCTTAGC GCTGGTAAAC CAAATGAAT TTTATTTGAT TGTGACAAA TAACTTANT CCGTGGTGTG
GAGAGGAGTT AGCCACTTA CAGCGGAAA ACAGAATCG CGACCATTTG GTATACTTAA AAGATTAATA ACACTGTTT ATTGAATAA GGCACACAG
330 LeuProGln SerValGluC ysArgProPh eValPheSer AlaGlyLysP rGlyrGluPh eSerIleAsp CysAspLysI leAsnLeuPh eArgGlyVal
2401 TTTGCGTTTC TTTATATGT TGGCACTTT ATGTATGTAT TTTCTACGTT TGTATACATA CTGGGTAAATA AGGAGTCTTA ATCATGCCAG TTCCTTGGC
AAACGCANAAG AAATATATACA ACGGTGAAA TACATACATA AAAGATGCAA ACGATGTAT GACGCATTAAT TCCTCAGAAAT TACTACGGTC AAAGAAACCG
363 PheAlaPheL euLeuTyrVa lAlaThrPhe MetYrValP heserThrPh eAlaAsnIle leuAlrAsnL yseGlySerOC *
83pドメインのホリ
2501 TAGGCCCCC CTATACCTTG TGTGCTGCC CGCGTTGCGT CCGGTGCAAT GAGGCCGGG CACTCGAAC TGAATGGAAG CCGCGGGCAC CTCGCTAACG
ATCGCGCGCG GATATGGAAC AGACGGAGG GCGCAAGCA GCGCCACGTA CTCGCGCCG GTGAGCTGG ACTTACCTTC GACGCGCGTG GAGCGATTGC
2601 GATTCAACAC TCCAAGATT GAGACCAATC AATCTTGGC GAGACTGTG AATGGCMAA CCAACCTTG GCAGAACATA TCCATCGCGT CCGCAATCTC
CTAAGTGTG AGTTCTTA CCTCGGTAG TTAAGAACG CTTTGAAC TTACGGTTT GGTGGGAAC GGTCTGTAT AGGTAGCGCA GCGGTAGAG
2701 CAGCAGCCGC AGCGGGGCA TCTCGGGCAG CGTGGGTCC TGGCCAGGG TGGCAGTAT GATGCTCTG TCGTTAGAGA CCCGCTAGC CTGGGGGGT
GTCTCGCGC TCGCGCGCT AGAGCCGCT GCAGCCAGG ACGGTGCC CAGCGTACTA GCACGAGAC AGCACTCCT GGGCGATCC GACCGGCCCA

【図10】

Figure 10 C

2801 TGCCTTACTG GTTAGCAGAA TGAATCACCG ATACGGGAGC GAACGTGAAAG CGACTGCTGC TGCMAAACGT CTGCGACTG AGCAACACA TGAATGCTCT
ACGGAATGAC CAATCGTCTT ACTTAGTGGC TAGCCGCTCG CTGCACTTC GCTGACAGC AGCTTTGCA GACGTGAC TCGTTGTTCT ACTTACACGA

2901 TCGGTTTCCG TGTTCGTAA AGCTTGAAA GCGGAAAGTC AGCGCCCTGC ACCATTATGT TCCGAACTG CATCGCAAGA TCGTCTGGC TACCCTGTGG
AGCCAAAGCC ACAAAACATT TCAGACTTT GGGCTTCAG TCGGGGAGC TGGTAATACA AGCCTAGAC GTAGGTTCT ACACACAGCC ATGGAGACAC

3001 AACACCTACA TCTGTATTA CGAAGCCCTG GCATTGACC TGAGTAAATT TTCTGTGTC CCGCCGCAAT CATACCGCA GTTGTTAAC CTCACACGT
TTGTGATGT AGACATAATT GCTTCGGAC CGTACTGGG ACTCATTA AAAGACCAAG GCGGGCTAG GATGCGGT CAACAATGG GAGTTTGCA

3101 TCCAGTAACC GGGCATGTC ATCATCAATA ACCCGATCG TGAGCATCTT CTCTGTTTC ATCGGATCA TTAACCCCAT GAACGAAT TCCCGTTAC
AGGTCAITGG CCCGTACAG TAGTAGTCAAT TGGGCATAGC ACTCGTAGA GAGACAAAG TAGCCATAGT AATGGGGTA CTGTCTTTA AGGGGATG

3201 ACGGAGGCAT CAAGTGACA AACAGAAA AACCGCCCTT AACATGAGCC GCTTTATCAG AAGCAACATA TTAAGCTTC TGAGAACT CAACGAGCTG
TGCTCCGTA GTTCACTGCT TTGTCTTTT TGGCGGGAA TTGTACCGGG CGAATAGTC TTGGTCTGT AATTGCAAG ACCCTTTGA GTTGCTGAC

3301 GACGGGATG AACAGGACGA CATCTGTAA TCGCTTCAG ACCAGCTGA TGAGCTTAC CGCAGATCC GGAATTGTA AACGTTATA TTTGTTAA
CTGCGCTTAC TTGTCCGCTT GTAGACACT AGCGAACTGC TGGTGGACT ACTCGAAATG GCGTCTTAG CCTTAACAT TTGCATTAAT AAAACAATTT

3401 ATTGCGCTTA AATTTTGT AATCAGCTC AATTTTAA CAAATGAGCCG AAATCGGCA AATCCCTTAT AAATCAAAAG AAATGACCGA GATAGGTTG
TAAGCGCAAT TTAATAACA TTAGTCCAG TAAAAATTG GTTAATCCGC TTAAAGCGTT TTAGGAAATA TTATGTTTC TTATCTGGCT CTATCCCAAC

3501 AGTGTGTTT CAGTTTGGA CAAGATCCA CTATTAAGA ACGTGAATC CAACGTCAA GGGGAAAAA CCGTCTATCA GGGCTATGGC CCACACTG
TCACACAAAG GTCAAACTT GTTCTAGGT GATTAATTCT TGCACCTGAG GTTGCAGTTT CCGGCTTTT GGCAGATAGT CCGGATACCG GGTGATGCAC

3601 AACCATCAC CTATCAAGT TTTTGGGT CGAGTGGCG TAAAGACTTA AATCGAAC CTAAAGGAG CCGCGATTT AGAGCTTGAC GGGGAAAGCC
TTGTAGTGG GATTAGTTCA AAAAACCCCA GCTCACAGGC ATTCTGTAT TTAGCTTGG GATTTCCTC GGGGCTTAA TCTGAAC TG CCGCTTTCGG

3701 GGGCAACGTG GCGAAGAAAG AAGGAAGAA AGCGAAAGAA GCGGCGCTTA GGGCGCTGCG AAGTGAAGG GTCAAGCTGC GCGTAACAC CACACCGGCC
CCGCTGCAC CGCTCTTCC TTCCCTTCTT TCGCTTCTT CCGCGCGAT CCGCGACCG TTCAATCGC CAATGCGAG CCGATTGCTG GTGTGGGCGG

3801 GCGCTTAATG CGCCGCTACA GGGCGCTGC GAATCTGACC TCGCGGTTT CGGTGATGAC GTGAAAAC TCTGACACAT GCACTTCCG GAGACGGTCA
CGCGAATTAC GCGCGGATGT CCGCGCAGG CTTAGACGG AGCGGCAAA GCACTACTG CCACTTTGG AACTGTGTA CGTGAAGGG CTCTGCCAAT

3901 CAGCTTCTCT GTAAGCGAT GCGGAGACA GACAAGCCG TCAGGCGCG TCAGGGGTG TTGCGGGTG TCGGGGCGA GCCATGACC AGTCACGTAG
GTGAAACAGA CATTCGCTTA CGGCCCTCT CTGTTCGGC AGTCCGCGC AGTGCACAC AACGCCAC AGCCCGCGT CCGTACTGGG TCACTGATC

【☒ 1 0】

Figure 10 D

4001 CGATAGCGGA GTGTACTAGT GCTTAACAT GCGGCATCAG AGCAANTGT ACTGAGAGTG CACCATATGCG GTGTGAAAT ACCGACACAGA TGCGTAAGGA
GCTATCGCCT CACATATGAC CGAATTGATA CGCCCAAGTC TCGTCAACA TGACTCTCAC GTGTATACG CCACACTTIA TGCGGTGICT ACGCATTGCT

4101 GAAATATCCG CATCAGCGCG TCTTCGCTT CTTGCTCAC TGACTGCTG CGCTGCGTCG TTCGCTGCG GCGAGCGGTA TCAAGTCACT CAAGGCGGT
CTTTATAGCG GTAGTCGCGG AGAAGCGGAA GAGCGAGTG ACTGAGCGAC GCGAGCCAGC AAGCGACGCG CGCTGCGCAT AGTGAAGTGA GTTTCGCGCA

4201 AATACGCTTA TCCACAGAAAT CAGGGGATTA GCGAGGAAAG AACATGTAG CAAGGCGCA GCAAAAGCGC AGGAACCGTA AAAAGCGCG GTTCTGCGG
TTATGCCAAT AGGTGCTTGA GTCCCTAAT GCGTCTTTC TTGTAACATC GTTTCGCGT GCTTTCGCG TCCTTGCGAT TTTTCGCGG CAAGGACCGC

4301 TTTTTCGATA GCGTCCGCCC CCCTGACGAG CATCAACAAA ATCGACGCTC AAGTCAAGAG TGCGGAAAC GACAGAGCT ATAAAGATAC CAGGCGTTTC
AAAAAGGTAT CCGAGGCGGG GGGACTGCTC GTAGTGTATT TAGCTGCGAG TTCAGTCTCC ACCGCTTGG GCTGTCTGA TATTCTATG GTCCGCAAG

4401 CCCCTGGAG CTCCTTCGTG CGCTCTCTG TTCGACCCCT GCGGCTAAC GATTAACCTGT CCGCTTTCT CCCTTCGGGA AGCGTGCGG TTTCATAG
GGGGAACCTTC GAGGAGACAC GCGAGAGGAC AAGGCTGGGA CGCGCAATGG CTTATGACA GCGGAAAGA GGGAAAGCCT TCGGACCGCG AAAAGATATC

4501 CTCAGGCTGT AGGTATCTCA GTTCGGTGA GGTGTTGCG TCCNAGCTGG GCTGTGTCA GGAACCGCC GTTCAGCCCG ACCGCTGCG CTTATCGGT
GAGTCCGACA TCCATAGAGT CAAGCACAT CCAGCAAGCG AGGTTGAC CCACACAGGT GCTTGGGGG CAAGTCGGG TGGGAGCGG GAATAGCCA

4601 AACTATCGTC TTGATTCGA CCCGGTAAAG CAGCACTTAAT CGCCACTGGC AGCAGCCACT GGTACAGAGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GCGGTGCTA
TTGATAGCAG AACTCAGGT GGGCCATTCT GTGTGAATA GCGGTGACCG TCGTCGGTGA CCAATGTCT AATGTCTG CTCATACAT CCGCCAGAT

4701 CAGAGTCTT GAAGTGAGG CCTACTACG GCTACACTAG AAGGACAGTA TTGTATAT GCGCTCTGCT GAAAGCAGTT ACCTTGCGAA AAAGAGTTG
GTCTCAAGAA CTTACACACC GATGTAGTC CGATGTATC TTCTGTAT AAACCATAGA CGCGAGACGA CTTGGGTCAA TGAAGCCTT TTTCTCAAC

4801 TAGCTCTGA TCCGGCAAC AACCAACCG TGATAGCGGT GGTTTTGG TTGCAAGCA GCAATTAGG CGCAAAAA AAGATCTCA AGAATCTCT
ATCGAAGACT AGGCCGTTG TTGGTGGG ACCATCGCCA CCMAAAAC AAAGTTGCT GGTCTATGC GCGCTTTT TTCTTAGAGT TCTTCAAGGA

4901 TTGATCTTT CTAGGCGTC TGAAGCTCAG TGAACGAAA ACTGAGCTTA AGGATTTG GTCATGAGAT TATCAAAAG GATCTTACG TAGATCCTT
AACTAGAAA GATGCCCGAG ACTGAGATC ACCTTGCTT TGAAGCAAT TCCCTAAAC CAGTACTCTA ATAGTTTTTCT CTAGAACTGG ATCTAGGAAA

5001 TAAATTAATA ATGAAGTTT AAATCAACT AAGATATATA TGAGTAACCT TGCTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT GAGGCACTTA TCTCAGCGAT
ATTATATTT TACTCAAAA TTGATTTAGA TTCAATAT ACTCATTTGA ACCAAGCTGT CAAGTTAC GAAATAGTCA CTCGCTGAGT AAGTCTGCTA

5101 CTGTCTATTT CGTTCATCCA TAGTGGCTG ACTCCCGCTC GTGTAGTAA CTACAGTACG GAGGCGCTTA CCATCTGGCC CCAAGTCTGC AATGATACG
GACAGATAAA GCAAGTAGGT ATCAACGAG TGAAGGCGAG CACATCTATT GATGCTATGC CTTCCGAAAT GGTAGACCG GGTACAGAGC TTACTATGCG

【図 10】

Figure 10 E

5201 CGAGACCCAC GCTCACCAGC TCCAGATTGA TCAGCAATGA ACCAGCCAGC CGGAAGGACC GAGCGCAGAA GTGCTCTGC AACTTATCC GCCTCCATCC
GCTTGGGGTG CCACTGGCCC AGGTCTAAT AGTCGTATT TGGTCGGTCG GCTTCCCGG CTCGGCTCTT CACCAGACG TTGAATAGG CCGAGTAGG

5301 AGCTATTGA TTGTTGCCGG GAAGCTAGAG TAACTAGTTC GCCAGTTAAT AGTTTGGCA ACCTTGTTC CATTCCTGCA GGCATCGTGG TGTACGGCTC
TCAGATTAAT AACACGGCC CTTCGATCTC ATTCAACAAG CGGTCAATTA TCMAAGCGCT TGCAACAACG GTAAAGAGCT CCGTAGCACC ACAGTCCGAG

5401 GTCGTTGGT ATGGCTCAT TCACTCCGG TTCCCAACA TCAGGGGAG TTACATGATC CCCATGTTG TGCAAAAAAG CGGTAGCTC CTTCGGCTT
CAGCAAAACA TACGAAAGTA AGTCGAGGCC AAGGTTGCT AGTTCCGCTC AATGTACTAG GGGTAGAAC ACCTTTTTC GCCAATCGAG GAAAGCAGGA

5501 CCGATCGTTG TCAGAAATGA GTTGGCCGCA GTGTTATCAC TCATGTTAAT GCGAGCACTG CATTAATCTC TTACTGTCAAT GCCATCCGTA AGATGCTTT
GGCTAGCAAC AGTCTTCATT CAACCGGCGT CACAATAGTG AGTACCAATA CCGTCGTGAC GTATTAGAG AATGACAGTA CCGTAGGCAT TCTACGAAAA

5601 CTGTGACTGG TGAATCTCA ACCAAGTCAI TCTGAGATA GTGTATGGGG CCAACGAGTT GCTCTGCCCC GCGGTCAACA CCGGATPATA CCGCGCCACA
GACACTGACC ACTCATGAGT TGGTTCAATA AGACTCTTAT CACATAGCCC GCTGGCTCMA CGAAGAACGG CCGCAATTGT GCCCTATTAT GCGCGGGTGT

5701 TAGCAGACT TTAAGAGTGC TCATCATTTG AAAACCTTCT TCGGGGGGAA AACTCTGAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCACTTCGAT GTAACCGACT
ATCGCTTGA AATTTCACG AGTAGTAACC TTTGCAAGA AGCCCCGCTT TTGAGAGTTC CTAGATGGC GACAACTCTA GGTCAAGCTA CATTGGGTGA

5801 CGTGACCCCA ACTGATCTTC AGCATCTTT ACTTTACCA GCGTTTCTGG GTGAGCAAAA ACAGAAAGGC AAATGCGGC AAAAAGGGA ATPAGGGGGA
GCACTGGGT TGAATAGAG TCGTAGAAA TGAAGTGT CGCAAGACC CACTCGTTT TGTCTTCCG TTTTACGGCG TTTTTCCT TATTCCGCT

5901 CACGGAATG TTGAATCTC AATCTCTCC TTTTCAATA TTAATGAGC ATTATCAGG GTTATGTCT CATGACGGA TACATATTG AATGATTTA
GTGCCCTTAC AACTATGAG TATGAGAGG AAAAAGTTAT AATAACTTC TAAATAGTC GTACTCGCT ATGTATTAAC TTACATTAAT

6001 GAAAAATGA CAATAGGGG TTCCGGCGAC ATTCCCGCA AAAGTCCAC CTGAGCTGA AGAAACCAAT ATTATCATGA CATTAACCTA TAAAAATAGG
CTTTTATT GTTATCCCC AAGCGCGTG TAAAGGGCT TTTCACGGTG GACTGCAGAT TCTTGTGA TAAATGACT GTAAATGGAT ATTTTATCC

6101 CGTATCAGA GGGCCTTTCG TCTTCAA
GCATAGTGT CCGGGAAGC AGAAGTT

【☒10】

Figure 10 F

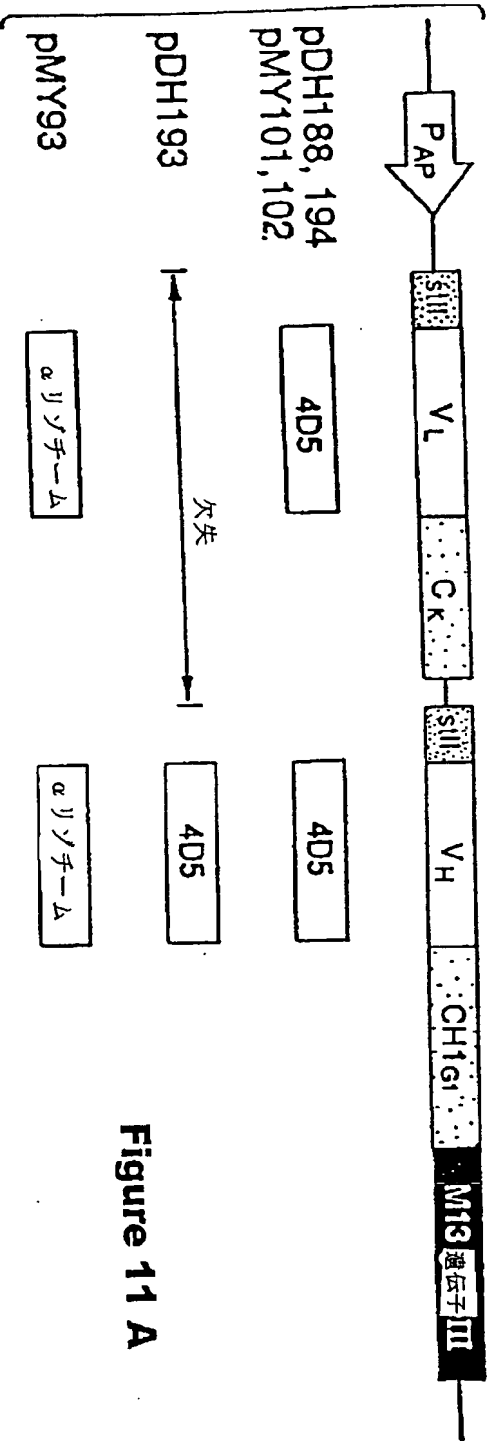


Figure 11 A

【図 11 B】

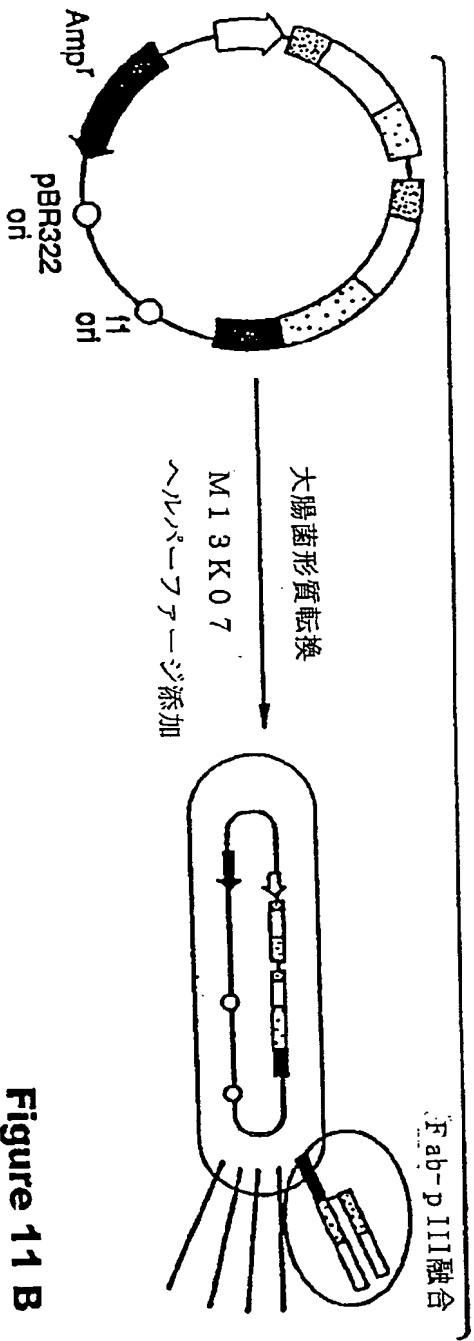


Figure 11 B

【図12】

(E25) - 軽鎖

DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSD YDGDSYMNWY QQKPGKAPKL LIYAASYLES GVPSRFSGSG
SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQSHEDPY TFGQGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL
NNFYPPREKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL S TLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT
KSFNRGEC

(E25) - 重鎖

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGYSIT SGYSWNWIRQ APGKGLEWVA SITYDGSTNY NPSVKGRITI
SRDDSKNTFY LQMNSLRAED TAVYYCARGS HYFGHWHFAV WGQGTSLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS
GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP
SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN
WYVDGVEVHN AKTKPREQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFPYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLDSGDSFFL YSKLTVDKSR
WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

(E26) - 軽鎖

DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASKPVD GEGDSYMNWY QQKPGKAPKL LIYAASYLES GVPSRFSGSG
SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQSHEDPY TFGQGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL
NNFYPPREKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL S TLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT
KSFNRGEC

(E26) - 重鎖

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGYSIT SGYSWNWIRQ APGKGLEWVA SITYDGSTNY NPSVKGRITI
SRDDSKNTFY LQMNSLRAED TAVYYCARGS HYFGHWHFAV WGQGTSLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS
GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP
SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN
WYVDGVEVHN AKTKPREQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFPYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLDSGDSFFL YSKLTVDKSR
WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

(E27) - 軽鎖

DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASKPVD GEGDSYMNWY QQKPGKAPKL LIYAASYLES GVPSRFSGSG
SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQSHEDPY TFGQGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL
NNFYPPREKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL S TLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT
KSFNRGEC

(E27) - 重鎖

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGYSIT SGYSWNWIRQ APGKGLEWVA SIKYSGETKY NPSVKGRITI
SRDDSKNTFY LQMNSLRAED TAVYYCARGS HYFGHWHFAV WGQGTSLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS
GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP
SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN
WYVDGVEVHN AKTKPREQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFPYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLDSGDSFFL YSKLTVDKSR
WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

Figure 12

【図13】

F(ab) フラグメント軽鎖**E26**

DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASKPVD GEGDSYLNWY QQKPGKAPKL LIYAASYLES
 GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQSHEDPY TFGQGTKVEI KRTVAAPSVF
 IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS
 STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

E27

DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASKPVD GEGDSYLNWY QQKPGKAPKL LIYAASYLES
 GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQSHEDPY TFGQGTKVEI KRTVAAPSVF
 IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS
 STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

重鎖**E26**

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGYSIT SGYSWNWIRQ APGKGLEWVA SITYDGSTNY
 NPSVKGRITI SRDDSKNTFY LQMNSLRAED TAVYYCARGS HYFGHWHFAV WGQGTILVTVS
 SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS
 SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHT

E27

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGYSIT SGYSWNWIRQ APGKGLEWVA SIKYSGETKY
 NPSVKGRITI SRDDSKNTFY LQMNSLRAED TAVYYCARGS HYFGHWHFAV WGQGTILVTVS
 SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS
 SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHT

Figure 13

【図14】

sFV フラグメント

E26

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGYSIT SGYSWNWIRQ APGKGLEWVA SITYDGSTNY
NPSVKGRITI SRDDSKNTFY LQMNSLRAED TAVYYCARGS HYFGHWHFAV WQGGTLVTVS
SEGGGSEGGG SEGGGSDIQL TQSPSSLSAS VGDRVITTCR ASKPVDGEGD SYLNWYQQKP
GKAPKLLIYA ASYLESGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ SHEDPYTFGQ
GTKVEIKR

E27

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGYSIT SGYSWNWIRQ APGKGLEWVA SIKYSGETKY
NPSVKGRITI SRDDSKNTFY LQMNSLRAED TAVYYCARGS HYFGHWHFAV WQGGTLVTVS
SEGGGSEGGG SEGGGSDIQL TQSPSSLSAS VGDRVITTCR ASKPVDGEGD SYLNWYQQKP
GKAPKLLIYA ASYLESGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ SHEDPYTFGQ
GTKVEIKR

Figure 14

【図15】

F(ab')₂ フラグメント軽鎖**E26**

DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASKPVD GEGDSYLNWY QOKPGKAPKL LIYAASYLES
 GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLOPEDFATY YCQQSHEDPY TFGQGTKVEI KRTVAAPSVF
 IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS
 STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

E27

DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASKPVD GEGDSYLNWY QOKPGKAPKL LIYAASYLES
 GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLOPEDFATY YCQQSHEDPY TFGQGTKVEI KRTVAAPSVF
 IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS
 STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

重鎖**E26**

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGYSIT SGYSWNWIRQ APGKGLEWVA SITYDGSTNY
 NPSVKGRITI SRDDSKNTFY LQMNSLRAED TAVYYCARGS HYFGHWHFAV WGQGTTLVTVS
 SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS
 SGLYSLSSV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPC

E27

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGYSIT SGYSWNWIRQ APGKGLEWVA SIKYSGETKY
 NPSVKGRITI SRDDSKNTFY LQMNSLRAED TAVYYCARGS HYFGHWHFAV WGQGTTLVTVS
 SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS
 SGLYSLSSV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPC

Figure 15

【手続補正書】特許法第184条の8第1項

【提出日】平成11年8月26日（1999. 8. 26）

【補正内容】

1. 原文89、94、97頁に記載の配列番号：8、15及び17に対応して、明細書の翻訳文に記載の配列番号：8、15及び17をそれぞれ次のように補正する。

「(2)配列番号：8の情報：

(i)配列の性質：

(A)配列の長さ：114アミノ酸

(B)配列の型：アミノ酸

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列の記載：配列番号：8：

Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	1	5	10	15
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Lys	Pro	Val	Asp	20	25	30	
Gly	Glu	Gly	Asp	Ser	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	35	40	45	
Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Tyr	Leu	Glu	Ser	50	55	60	
Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	65	70	75	
Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	80	85	90	
Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	95	100	105	
Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	110	114								

(2)配列番号：15の情報：

(i)配列の性質：

(A)配列の長さ：218アミノ酸

(B)配列の型：アミノ酸

(D)トポロジー：直鎖状

(x i)配列の記載：配列番号：15：

Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	1	5	10	15
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Lys	Pro	Val	Asp	20	25	30	
Gly	Glu	Gly	Asp	Ser	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	35	40	45	
Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Tyr	Leu	Glu	Ser	50	55	60	
Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	65	70	75	
Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	80	85	90	
Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	95	100	105	
Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	110	115	120	
Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	125	130	135	
Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	140	145	150	
Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	155	160	165	
Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	170	175	180	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	185	190	195	
Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	200	205	210	

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215 218

(2)配列番号：17の情報：

(i)配列の性質：

(A)配列の長さ：218アミノ酸

(B)配列の型：アミノ酸

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列の記載：配列番号：17：

Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	1	5	10	15
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Lys	Pro	Val	Asp	20	25	30	
Gly	Glu	Gly	Asp	Ser	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	35	40	45	
Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Tyr	Leu	Glu	Ser	50	55	60	
Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	65	70	75	
Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	80	85	90	
Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	95	100	105	
Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	110	115	120	
Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	125	130	135	
Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	140	145	150	
Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	155	160	165	
Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	170	175	180	

Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val
				185					190					195
Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr
				200					205					210
Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys							
				215			218							」

2. 特許請求の範囲を別紙のように補正する。
3. 図面のFig. 2及びFig. 12を別紙のように補正する。

請求の範囲

1. アスパルチル異性化の不活性化を示さず、無修飾ポリペプチド以上である標的分子IgEに対する親和性を有する抗IgE抗体である修飾ポリペプチドを調製する方法において、

- a) 異性化を受けやすいアスパラチル残基を同定し；
 - b) 代替残基を置換し、得られた変異体を標的分子に対する親和性に対して、ファージディスプレイを使用する親和成熟法でスクリーニングし、該工程が、
 - (i) ポリペプチドのアミノ酸配列の変化を生じるポリペプチドをコードしている遺伝子における一又は複数のコドンの置換、欠失、又は挿入により、ファージコートタンパク質に融合した構造的に関連するポリペプチドのライブラリを調製し、
 - (ii) 該ポリペプチドをコードしているDNAを含むファージミド粒子の表面に各関連ポリペプチドの単一の複製を示すことを更に含み；
 - c) アスパラチル残基が変化し、無修飾ポリペプチド以上である標的分子に対する親和性を有する修飾ポリペプチドを選択する；
- ことを含んでなる方法。

2. 無修飾抗体が図12【配列番号：13-14】に「E25」として示された配列を有している請求項1に記載の方法。

3. 置換された残基が可変軽鎖CDR1残基Asp32Glu、Gln27Lys及びSer28Proである請求項2に記載の方法。

4. 更に置換された残基が可変重鎖CDR2残基Thr53Lys、Asp5

5 Ser、Ser 57 Glu及びAsn 59 Lysである請求項3に記載の方法。

5. 請求項1に記載の方法を実施することを含んでなる、抗体のブタクサ誘発性ヒスタミン放出阻害性を改良する方法。

6. 図13 [配列番号：19及び20]の軽鎖配列及び重鎖配列「e26」に対して少なくとも70%の配列同一性を示し、可変軽鎖CDR1残基32 Glu、27 Lys及び28 Proを含んでなる軽鎖配列と重鎖配列を有する抗体分子。

7. F(ab)フラグメント [配列番号：19-20]、sFvフラグメント [配列番号：22]又はF(ab)'₂ [配列番号：24-25]からなる群から選択されるe26配列を含んでなる請求項6に記載の抗体分子。

8. 図13 [配列番号：19及び21]の軽鎖配列及び重鎖配列「e27」に対して少なくとも70%の配列同一性を示し、可変軽鎖CDR1残基32 Glu、27 Lys及び28 Proを含んでなる軽鎖配列と重鎖配列を有する抗体分子。

9. F(ab)フラグメント [配列番号：19及び21]、sFVフラグメント [配列番号：23]又はF(ab)'₂ [配列番号：24及び26]からなる群から選択されるe27配列を含んでなる請求項8に記載の抗体分子。

10. 図13 [配列番号：19及び20]の「e26」をコードするものに対して少なくとも85%の配列同一性を示す配列を有する核酸分子であって、可変軽鎖CDR1残基32 Glu、27 Lys及び28 Proを含んでなる抗体分子をコードする核酸分子。

11. F(ab) [配列番号：19及び20]、sFV [配列番号：2

2]又はF(ab)'₂ [配列番号：24及び25]からなる群から選択されるe26抗体フラグメントをコードする配列を有する請求項10に記載の核酸分子。

12. 図13 [配列番号：19及び21]の「e27」をコードするものに対して少なくとも85%の配列同一性を示す配列を有する核酸分子であって、可変軽鎖CDR1残基32 Glu、27 Lys及び28 Proを含んでなる抗体分子をコードする核酸分子。

13. F(a b) [配列番号：19及び21]、s F V [配列番号：23]又はF(a b)'₂ [配列番号：24及び26]からなる群から選択されるe 27抗体フラグメントをコードする配列を有する請求項12に記載の核酸分子。

14. 請求項6ないし9の何れか1項に記載の抗体分子と混合して医薬的に許容可能な賦形剤を含有してなる組成物。

15. 請求項6ないし9の何れか1項に記載の抗体分子の治療上有効量を投与することを含んでなる、哺乳動物におけるヒスタミンのI g E媒介性生成を低減又は防止する方法。

16. 請求項6ないし9の何れか1項に記載の抗体分子の治療上有効量を、投与を必要とする哺乳動物に投与することを含んでなる、I g Eにより媒介された疾患の治療方法。

【図2】

	10	20	30	40
e27	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASKPVD	GEGDSYLNWY
e26	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASKPVD	GEGDSYLNWY
e426	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASQSVD	YEGDSYLNWY
e25	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASQSVD	YDGD SYMNWY
			CDR-L1	
	50	60	70	80
e27	QQKPGKAPKL	LIYAASYLES	GVPSRFSGSG	SGTDFTLTIS
e26	QQKPGKAPKL	LIYAASYLES	GVPSRFSGSG	SGTDFTLTIS
e426	QQKPGKAPKL	LIYAASYLES	GVPSRFSGSG	SGTDFTLTIS
e25	QQKPGKAPKL	LIYAASYLES	GVPSRFSGSG	SGTDFTLTIS
		CDR-L2		
	90	100	110	
e27	SLQPEDFATY	YCQQSHEDPY	TFGQGTKVEI	KRTV
e26	SLQPEDFATY	YCQQSHEDPY	TFGQGTKVEI	KRTV
e426	SLQPEDFATY	YCQQSHEDPY	TFGQGTKVEI	KRTV
e25	SLQPEDFATY	YCQQSHEDPY	TFGQGTKVEI	KRTV
		CDR-L3		
	10	20	30	40
e27	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAVSGYSIT	SGYSWNWIRQ
e26	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAVSGYSIT	SGYSWNWIRQ
e426	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAVSGYSIT	SGYSWNWIRQ
e25	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAVSGYSIT	SGYSWNWIRQ
			CDR-H1	
	50	60	70	80
e27	APGKGLEWVA	SIKYSGETKY	NPSVKGRITI	SRDDSKNTFY
e26	APGKGLEWVA	SITYDGSTNY	NPSVKGRITI	SRDDSKNTFY
e426	APGKGLEWVA	SITYDGSTNY	NPSVKGRITI	SRDDSKNTFY
e25	APGKGLEWVA	SITYDGSTNY	NPSVKGRITI	SRDDSKNTFY
		CDR-H2		
	90	100	110	
e27	LQMNSLRAED	TAVYYCARGS	HYFGHWHEFAV	WGQG
e26	LQMNSLRAED	TAVYYCARGS	HYFGHWHEFAV	WGQG
e426	LQMNSLRAED	TAVYYCARGS	HYFGHWHEFAV	WGQG
e25	LQMNSLRAED	TAVYYCARGS	HYFGHWHEFAV	WGQG
		CDR-H3		

FIG._2

【図12】

(E25) - 輕鎖

DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSDV YDGD SYMNWY QQKPGKAPKL LIYAASYLES GVPSRFSGSG
SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQSHEDPY TFGQGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL
NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL S TLTL SKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT
KSFNRGEC

(E25) - 重鎖

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGYSIT SGYSWNWIRQ APGKGLEWVA SITVDGSTNY NPSVKGRITI
SRDDSKNTFY LQMNSLRAED TAVYYCARGS HYFGHWFAV WQGTGLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS
GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSV TVPSSSLGTQ TYICNVNHP
SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN
WYVDGVEVHN ARTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR
WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

(E26) - 輕鎖

DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASKPVD GEGDSYLNWY QQKPGKAPKL LIYAASYLES GVPSRFSGSG
SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQSHEDPY TFGQGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL
NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL S TLTL SKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT
KSFNRGEC

(E26) - 重鎖

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGYSIT SGYSWNWIRQ APGKGLEWVA SITVDGSTNY NPSVKGRITI
SRDDSKNTFY LQMNSLRAED TAVYYCARGS HYFGHWFAV WQGTGLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS
GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSV TVPSSSLGTQ TYICNVNHP
SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN
WYVDGVEVHN ARTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR
WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

(E27) - 輕鎖

DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASKPVD GEGDSYLNWY QQKPGKAPKL LIYAASYLES GVPSRFSGSG
SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQSHEDPY TFGQGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL
NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL S TLTL SKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT
KSFNRGEC

(E27) - 重鎖

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGYSIT SGYSWNWIRQ APGKGLEWVA SIKYSGETKY NPSVKGRITI
SRDDSKNTFY LQMNSLRAED TAVYYCARGS HYFGHWFAV WQGTGLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS
GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSV TVPSSSLGTQ TYICNVNHP
SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN
WYVDGVEVHN ARTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR
WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

FIG. 12

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/13 C07K16/00 C07K16/42 A61K39/395		International Application No. PCT/US 98/13410
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. CACIA ET AL.: "Isomerization of an aspartic acid residue in the complementarity-determining regions of a recombinant antibody to human IgE: Identification and effect on binding affinity." BIOCHEMISTRY, vol. 35, no. 6, 13 February 1996, pages 1897-1903, XP002094430 Washington, DC, USA cited in the application see the whole document --- -/--	1
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 February 1999		Date of mailing of the international search report 12/03/1999
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HW Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Nooij, F

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 98/13410

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	J. LOWENSON ET AL.: "[Identification of isoaspartyl-containing sequences in peptides and proteins that are unusually poor substrates for the class II protein carboxyl methyltransferase." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 265, no. 6, 25 February 1990, pages 3106-3110, XP002094431 Baltimore, MD, USA see abstract	1
Y	US 4 255 519 A (TERADA ET AL.) 10 March 1981 see column 9, line 32 - line 48	1
A	L. PRESTA ET AL.: "Humanization of an antibody directed against IgE." THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 151, no. 5, 1 September 1993, pages 2623-2632, XP002094432 Baltimore, MD, USA see abstract see table III	1-31
A	WO 93 04173 A (GENENTECH, INC.) 4 March 1993 cited in the application see examples see claims see seq. id. no. 9	1-31
A	J. LOWE ET AL.: "Allergen-induced histamine release in rat mast cells transfected with the alpha subunits of FcepsilonRI." JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 184, no. 1, 17 July 1995, pages 113-122, XP002094433 Amsterdam, The Netherlands see abstract see figures see table 1	1-31
A	R. SHIELDS ET AL.: "Inhibition of allergic reactions with antibodies to IgE." INTERNATIONAL ARCHIVES OF ALLERGY AND IMMUNOLOGY, vol. 107, May 1995, pages 308-312, XP000611560 Basel, Switzerland cited in the application see abstract	1-31

-/--

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No. PCT/US 98/13410
--

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	H. LOWMAN ET AL.: "Selecting high-affinity binding proteins by monovalent phage display." BIOCHEMISTRY, vol. 30, no. 45, 12 November 1991, pages 10832-10838, XP002094434 Washington, DC, USA cited in the application see abstract see figure 2 -----	2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 98/13410

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark: Although claims 24-31 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (t)) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 98/13410

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4255519 A	10-03-1981	JP 1305881 C	13-03-1986
		JP 55015736 A	04-02-1980
		JP 60031471 B	22-07-1985
		DE 2929530 A	07-02-1980
		GB 2025979 A, B	30-01-1980
WO 9304173 A	04-03-1993	AU 2498192 A	16-03-1993
		AU 7038096 A	16-01-1997
		EP 0602126 A	22-06-1994
		JP 6509944 T	10-11-1994

Form PCT/ISA210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	FI	テ-マ-ド (参考)
C12P 21/08		C12N 15/00	ZNAC
(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW			
(72) 発明者	ジャルデュー, ポーラ エム. アメリカ合衆国 カリフォルニア 94410, サン マテオ, ハイワード アヴェニュー 33 ナンバー110		
(72) 発明者	ロウ, ジョン アメリカ合衆国 カリフォルニア 94588, プレゼントン, アピアン ストリート 3739		